

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

WILLIAN FELIPE HADIAK AMALIO DE SOUZA

AÇÃO DO PRECURSOR DA MELANINA, O ÁCIDO 5,6-DIHIDROXI-INDOL-2-CARBOXÍLICO (DHICA) NO REPARO DE DNA EM MODELO CELULAR E PLASMIDIAL



CURITIBA

2016

WILLIAN FELIPE HADIAK AMALIO DE SOUZA

AÇÃO DO PRECURSOR DA MELANINA, O ÁCIDO 5,6-DIHIDROXI-INDOL-2-CARBOXÍLICO (DHICA) NO REPARO DE DNA EM MODELO CELULAR E PLASMIDIAL

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

Orientadora: Profa. Dra. Glaucia Regina Martinez  
Coorientadora: Profa. Dra. Marta Margarete Cestari

CURITIBA  
2016

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Souza, Willian Felipe Hadiak Amalio de  
Ação do precursor da melanina, o ácido 5,6-Dihidroxi-indol-2-  
Carboxílico (Dhica) no reparo de DNA em modelo celular e plasmidial. /  
Willian Felipe Hadiak Amalio de Souza. – Curitiba, 2016.  
77 p.: il.

Orientadora: Glaucia Regina Martinez  
Coorientadora: Marta Margarete Cestari  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências -  
Bioquímica.

1. Melanoma 2. Melaninas 3. Oxigênio singlete 4. Reparo de DNA 5.  
Ensaio cometa I. Título II. Martinez, Glaucia Regina III. Cestari, Marta  
Margarete IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências  
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (22. ed.) 572.86459  
616.994


## TERMO DE APROVAÇÃO

WILLIAN FELIPE HADIAK AMALIO DE SOUZA

AÇÃO DO PRECURSOR DA MELANINA, O ÁCIDO 5,6-DIHIIDROXI-INDOL-2-CARBOXÍLICO (DHICA) NO REPARO DE DNA EM MODELO CELULAR E PLASMIDIAL

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

  
Prof.ª Dr.ª Glaucia Regina Martinez - Orientadora  
Departamento de Bioquímica, UFPR

  
Prof.ª Dr.ª Sheila M. B. Winnischofer  
Departamento de Bioquímica, UFPR

  
Dr.ª Andreia Akemi Suzukawa  
ICC-FIOCRUZ-PR

Curitiba, 28 de abril de 2016.

**Aos meus queridos pais Denise e Sergio**

**A minha noiva Daniele**

**Aos meus avós**

**Aos meus tios**

**Por todo o apoio e dedicação!**

**Amo todos vocês!**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, que se mostrou criador, que foi criativo. Seu fôlego de vida em mim me foi sustento e me deu coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades e busca por algo maior.

À pós-graduação em Ciências – Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade.

À orientadora Glaucia Regina Martinez por ter confiado em meu trabalho, mesmo sabendo das altas cargas de tarefas. Pelo seu respeito e profissionalismo, pela sua exímia relação professor aluno, e principalmente por toda a cobrança que se fez necessária para estimular o aprendizado.

À professora Dra. Marta Margarete Cestari pela co-orientação. A professora Dra. Daniela Morais Leme pela colaboração e apoio no ensaio Cometa.

Aos professores e colegas dos laboratórios de oxidações e genética pela ajuda nos momentos de dúvidas.

À secretária Sra. Irene Luzia Forghieri Rosa do programa de Pós Graduação em Bioquímica, por seu papel decisivo na minha entrada no programa de mestrado.

Aos colegas de laboratório que direta ou indiretamente colaboraram com a produção deste estudo. Em especial para o colega Gustavo Jabor por sua paciência no auxílio em relembrar os preceitos básicos da química.

Ao colega Geonildo Disner por estar presente nos ensinamentos e execução das partes mais importantes do ensaio Cometa.

Aos técnicos dos laboratórios de oxidações, Priscila Iansen, pelas longas conversas clínicas e do laboratório de Microscopia Srta. Liz pela ajuda nos momentos de prazo mais apertado.

Aos colaboradores do laboratório W.F. Clinilabor por terem assumidos responsabilidades além da sua realidade para suprir minha ausência e permitir concluir o programa.

A minha noiva, pela compreensão durante os períodos de ausência, pelo amor, pela ajuda nos ensaios e pela presença nas rotinas noturnas de experimentos, mesmo após longo período de trabalho.

A todos os meus alunos que através da troca de incentivos possibilitaram este crescimento profissional mutuo, sendo o principal motivo do meu ingresso no programa.

E um agradecimento especial aos meus pais, pois sem dúvida todas as minhas dificuldades não chegam à metade dos seus esforços para me manter no período de estudos mesmo quando outras responsabilidades eram de grande importância. À minha mãe Denise Cristina que sem dúvida teve o maior aprendizado técnico/laboratorial durante meu mestrado pois assumiu uma responsabilidade longe de seu mundo, aprendendo neste período de 2 anos em que estive parcialmente ausente, praticamente tudo referente a laboratórios clínicos, desempenhando o cargo atribuído a mim tão bem quanto. Ao meu pai Sergio Luiz por apoio, incentivo e principalmente por ter aberto mão de sua principal companheira de trabalho e viagem, sua esposa. Por todos os almoços comigo perto do politécnico, fazendo-nos esquecer por um momento das correrias do dia a dia. Pela nossa reforma em casa, mostrando que por mais que a vida nos atribua diversas funções, o momento familiar sempre será o de maior importância.

Aos meus avós, Sr. Stefano Hadiak, Sra. Rose Marli Hadiak, Sr. Hamilton Souza e Sra. Elza Souza (*in memoriam*) e meu tio Marcos Hadiak por sempre confiar, me incentivar e elogiar em todos os passos que dei, mesmo os mais simples.

As agências financiadoras, CNPq, CAPES, Fundação Araucária e INCT de Processos Redox em Biomedicina – Redoxoma.

**Half of what separates the successful  
Entrepreneurs from all the rest  
Is pure perseverance.**

*Steve Jobs*



## RESUMO

O câncer do tipo melanoma está entre os cânceres de pele com maior taxa de mortalidade. A doença caracteriza-se por lesões hiperpigmentadas na epiderme sendo a coloração destas lesões devido ao acúmulo de melanina, a qual divide-se em dois compostos poliméricos chamados de feomelanina de coloração amarelo-vermelha e a eumelanina de coloração Preta-Marrom. A eumelanina é composta de unidades monoméricas de três catecóis indólicos: dopaquinona (DOPA), dihidroxi-indol (DHI) e ácido 5,6-dihidroxi-indol-2-carboxílico (DHICA). Estudos demonstraram que radiações ultravioleta (UV) são capazes de promover aumentos dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células, onde o oxigênio molecular singlete ( $^1\text{O}_2$ ) é uma das principais espécies formadas e a radiação UVA a principal causa. Outros estudos (*in vitro*) demonstraram que o DHICA pode promover a quebra do DNA fita simples em DNA plasmidial, capacidade que é perdida quando o DHICA é pré-oxidado por  $^1\text{O}_2$ , verificaram também que o DHICA pode interagir com uma enzima de reparo procariótica diminuindo sua capacidade de ação. A partir disto, o objetivo do trabalho foi verificar se o precursor da melanina, o DHICA, é capaz de suprimir o reparo de DNA em células produtoras de melanina B16-F10 e Melan-A (modelo celular), e também avaliar sua ação frente à enzima de reparo hOGG1 usando como substrato o plasmídeo (pUC18) (modelo livre de células). Inicialmente, os ensaios de viabilidade celular frente ao composto DHICA e DHICA + Terapia fotodinâmica com Rosa Bengala acetato (RBAC-PDT) pelos métodos MTT e Cristal Violeta mostrou que somente o DHICA não diminuiu a viabilidade celular nas linhagens B16-F10 e Melan-A, assim como sua utilização concomitante com RBAC-PDT não alterou os resultados da viabilidade. Resultados do Ensaio Cometa demonstraram que 18 horas de incubação após à PDT, as células de ambas as linhagens tiveram seus níveis de danos aproximando-se nos níveis basais, permitindo concluir que DHICA não interfere na capacidade de reparo dessas células. Considerando que resultados anteriores mostraram inibição do reparo pelo DHICA quando foi utilizada a enzima bacteriana FPG, tornou-se essencial avaliar a capacidade da enzima hOGG1 em reconhecer danos oxidativos (8-oxodGuo) na presença de DHICA. Os resultados mostraram que o DHICA não afetou o reconhecimento das lesões 8-oxodGuo pela enzima hOGG1 em plasmídeo pUC18 oxidado. Diante disso, os dados obtidos com este trabalho mostraram que o DHICA não se apresenta citotóxico às células B16-F10 e Melan-A até a concentração de 150  $\mu\text{M}$  na incubação de 18h e atua de maneira diferente sobre as enzimas de reparo da 8-oxodGuo em eucariotos e procariotos.

Palavras-Chave: Melanoma; Melanina; DHICA; Oxigênio Singlete; Reparo; hOGG1; Ensaio Cometa.

## ABSTRACT

The melanoma cancer is among the cancers of the skin with a higher mortality rate. The disease is characterized by hyperpigmented lesions in the epidermis and staining of these lesions due to accumulation of melanin, which is divided into two polymeric compounds called pheomelanin yellow-red color and eumelanin brown-black coloration. The eumelanin is comprised of three monomeric units indole catechols: dopaquinone (DOPA), dihydroxy-indole (DHI) and 5,6-dihydroxy-indole-2-carboxylic acid (DHICA). Studies have shown that ultraviolet (UV) are capable of promoting increased levels of reactive oxygen species (ROS) in cells where the singlet molecular oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) is one of the main species formed and UVA radiation the main cause. Other studies (*in vitro*) have shown that DHICA may promote DNA single strand break of plasmid DNA, capacity is lost when the DHICA is pre-oxidized by  $^1\text{O}_2$ , there also DHICA that can interact with a prokaryotic repair enzyme reducing its capacity for action. From this, the objective of this study was to determine whether the precursor of melanin, DHICA, is able to suppress the DNA repair in cells producing B16-F10 melanin and Melan-A (cell model), and evaluate front action the repair enzyme hOGG1 using as substrate plasmid (pUC18) (cell-free model). Initially, the cell viability assays against DHICA compound and DHICA + Photodynamic therapy with Rose Bengal acetate (RBAC-PDT) for the MTT and Crystal Violet methods showed that only the DHICA not decreased cell viability in the B16-F10 and Melan-A strains as well as concomitant use with RBAC-PDT did not change the results of the fall of viability. Comet assay results demonstrated that 18 hours of incubation after PDT the cells of both strains had their damage levels approaching at basal levels, allowing concluding that DHICA not interfere with the ability of these cells to repair. Whereas previous results showed inhibition of the repair DHICA when FPG bacterial enzyme was used, it became essential to evaluate the ability of the enzyme to recognize hOGG1 oxidative damage (8-oxodGuo) in the presence of DHICA. The results showed that DHICA did not affect the recognition of the injuries oxodGuo 8-oxidized enzyme hOGG1 plasmid pUC18. Thus, the data obtained from this study showed that the DHICA does not present cytotoxic to B16-F10 cells and Melan-up to the concentration of 150  $\mu\text{M}$  in the incubation 18h and acts differently on 8- repair enzymes oxodGuo in eukaryotes and prokaryotes.

Key-words: Melanoma. Melanin. DHICA. Singlete Oxygen. Repair. hOGG1. Comet Assay.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DO MELANOMA.....	20
FIGURA 2-	DESENHO ESQUEMÁTICO DE UM MELANÓCITO.....	22
FIGURA 3-	ESQUEMA DA PENETRAÇÃO DOS RAIOS UVA E UVB NAS CAMADAS DA PELE.....	23
FIGURA 4-	VIAS DE BIOSÍNTESE DAS MELANINAS.....	24
FIGURA 5-	MECANISMOS DE AÇÃO DAS ENZIMAS REPARADORAS OGG1 E MYH.....	31
FIGURA 6-	DESCRIÇÃO VISUAL DAS FORMULAS UTILIZADAS PARA CÁLCULOS DOS PARÂMETROS FORNCEDICOS PELO SCANNER DE LÂMINAS UTILIZADO NO ENSAIO COMETA..	43
FIGURA 7-	FORMAS TOPOLÓGICAS DE UM PLASMÍDEO E DIFERENÇAS DE CORRIDA QUANDO SUBMETIDOS A ELETROFORESE.....	44
FIGURA 8-	VIABILIDADE DE CÉLULAS B16-F10 PELO MÉTODO DE MTT.....	47
FIGURA 9-	VIABILIDADE DE CÉLULAS MELAN-A PELO MÉTODO DE MTT.....	48
FIGURA 10-	VIABILIDADE DE CÉLULAS B16-F10 PELO MÉTODO DE CRISTAL VIOLETA.....	49
FIGURA 11-	VIABILIDADE DE CÉLULAS MELAN-A PELO MÉTODO DE CRISTAL VIOLETA.....	50
FIGURA 12-	CONTROLES UTILIZADOS NO ENSAIO COMETA CLÁSSICO E OXIDATIVO.....	51
FIGURA 13-	ENSAIO COMETA CLÁSSICO DE CÉLULAS B16-F10 E MELAN-A TEMPO 0.....	53
FIGURA 14-	ENSAIO COMETA OXIDATIVO DE CÉLULAS B16-F10 E MELAN-A TEMPO 0.....	54
FIGURA 15-	ENSAIO COMETA CLÁSSICO DE CÉLULAS B16-F10 E MELAN-A TEMPO 18.....	55
FIGURA 16-	ENSAIO COMETA OXIDATIVO DE CÉLULAS B16-F10 E MELAN-A TEMPO 18.....	56
FIGURA 17-	INCUBAÇÃO DO DNA (pUC18) COM RB, DHICA E HOGG1 – NÃO IRRADIADO.....	58

FIGURA 18- INCUBAÇÃO DO DNA (pUC18) COM RB, DHICA E HOGG1 – IRRADIADO.....	59
---	----

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	PRINCIPAIS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO COM FORMAÇÃO <i>IN VIVO</i> .....	26
TABELA 2-	ORBITAIS MOLECULARES DO OXIGÊNIO SINGLETE E DO SEU ESTADO FUNDAMENTAL TRIPLETE.....	27
TABELA 3-	SUBSTRATOS DAS DNA GLICOSILASES, CLASSIFICAÇÃO E OCORRÊNCIA EM DIFERENTES ORGANISMOS.....	30
TABELA 4-	COMPOSIÇÃO DOS TAMPÕES UTILIZADOS PARA A ENZIMA hOGG1 EM DIFERENTES ENSAIOS.....	36
TABELA 5-	TIPOS DE PLACAS UTILIZADAS POR EXPERIMENTO E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES CELULARES PLAQUEADAS.....	38
TABELA 6-	CONCENTRAÇÃO E TEMPO DE EXPOSIÇÃO DAS DIFERENTES FORMAS DE ROSA BENGALA UTILIZADOS.....	39
TABELA 7-	CONCENTRAÇÃO E TEMPO DE EXPOSIÇÃO DO DHICA PARA OS DIFERENTES ENSAIOS REALIZADOS.....	39

## LISTA DE SIGLAS

ANOVA	-	<i>Análise de variância</i>
AP	-	Sítio abásico
BER	-	Reparo por excisão de bases
CA	-	Forma circular aberta do plasmídeo
CGH	-	Hibridização Genômica Comparativa
CV	-	Cristal Violeta
DHI	-	5,6-Dihidroxi-indol
DHICA	-	Ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
DNA	-	Ácido Desoxirribonucleico
DOPA	-	Dopaquinona
DSBR	-	Reparo de Quebra da Fita Dupla
EDTA	-	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ERA	-	Reparo Alternativo por Excisão
ESR	-	Espectroscopia de Ressonância de Spin Eletrônico
FISH	-	Hibridização <i>in situ</i>
FPG	-	Enzima formamidopirimidina-DNA-glicosilase
HBSS	-	Solução Salina Balanceada de Hanks
hOGG1	-	8-oxoguanina DNA N-glicosilase 1, isoforma humana
IHQ	-	Imunohistoquímica
INCA	-	Instituto Nacional do Câncer
LI	-	Forma Linear do Plasmídeo
LED	-	Diodo de emissão de luz
MMR	-	Reparo de erro de pareamento
MMS	-	Metil metanosulfonato
MTT	-	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
MYH	-	A/G – Adenina DNA glicosilase específica
NER	-	Reparo por Excisão de Nucleotídeo
OGG1	-	8-oxoguanina DNA N-glicosilase 1
PBS	-	Solução Salino Fosfato Tamponada
PCNA	-	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
PDT	-	Terapia Fotodinâmica
pH	-	Potencial Hidrogeniônico

POL $\delta$	-	DNA polimerase $\delta$ (Delta)
POL $\beta$	-	POL $\beta$ – DNA polimerase $\beta$ (Beta)
POL $\epsilon$	-	POL $\epsilon$ – DNA polimerase $\epsilon$ (Épsilon)
pUC18	-	pUC18 – Plasmídeo pUC 18
RB	-	Rosa Bengala
RBAc	-	Rosa Bengala Acetato
RFC	-	Fator de Replicação C
ROS	-	Espécies reativas de oxigênio
SFB	-	Soro Fetal Bovino
SE	-	Forma Superenovelada do plasmídeo
SSBR	-	Reparo da Quebra de Fita Simples
TBE	-	Tampão Tris Borato EDTA
UV	-	Ultravioleta
UVA	-	Ultravioleta A
UVB	-	Ultravioleta B
6H5MICA	-	Ácido 6-hidroxi-5-metoxi-indol-2-carboxílico
8-oxoG	-	8-oxo-7,8-dihidroguanina
8-oxodGuo	-	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	17
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	19
2.1	MELANOMA	19
2.2	MELANINA	21
2.3	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DANOS AO DNA	26
3	<b>OBJETIVOS</b>	34
3.1	OBJETIVO GERAL	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	35
4.1	REAGENTES	35
4.2	LIMPEZA E ESTERILIZAÇÃO DOS MATERIAIS	36
4.3	CULTIVO CELULAR	37
4.4	PLAQUEAMENTO	38
4.5	FOTOSENSIBILIZAÇÃO E INCUBAÇÃO COM DHICA	38
4.6	VIABILIDADE CELULAR	39
4.6.1	ENSAIO MTT	40
4.6.2	ENSAIO CRISTAL VIOLETA	40
4.7	ENSAIO COMETA	41
4.8	ENSAIO PLASMIDIAL	43
4.8.1	ENSAIO DE QUEBRAS DAS FITAS DO DNA	43
4.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	45
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	46
5.1	VIABILIDADE CELULAR	46
5.1.1	Viabilidade de células B16-F10 e Melan-A na ausência e presença de DHICA, fotossensibilizador e irradiação pelo método de MTT	46
5.1.2	Viabilidade de células B16-F10 e Melan-A na ausência e presença de DHICA, fotossensibilizador e irradiação pelo método de Cristal Violeta	48



5.2	ENSAIO COMETA .....	51
5.2.1	Avaliação dos danos e reparo do DNA pelo Ensaio Cometa .....	51
5.3	ENSAIO COM DNA PLASMIDIAL.....	57
5.3.1	Incubação do DNA com DHICA e $^1\text{O}_2$ .....	57
6	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>
	<b>ANEXO 1 – AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE FIGURA DA REVISTA PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY.....</b>	<b>75</b>
	<b>ANEXO 2 – AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE FIGURA DA REVISTA NUCLEIC ACIDS RESEARCH.....</b>	<b>76</b>
	<b>ANEXO 3 – AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE FIGURA DO SITE DO INSTITUTO NANOCELL.....</b>	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo é um tipo de neoplasia maligna altamente metastática e agressiva, de forma que pacientes com diagnóstico tardio apresentam sobrevida bastante baixa, sendo então uma das principais causas de morte por doenças relacionadas à pele (BRESSAC-DE-PAILLERETS *et al.*, 2002).

O melanoma se caracteriza principalmente por apresentar uma hiperpigmentação na região de lesão, sendo esta coloração decorrente do acúmulo de melanina (pigmento normalmente produzido nos melanócitos e que determina a cor da pele). A melanina tem estrutura polimérica e de composição heterogênea. Divide-se em dois principais tipos, a feomelanina, de cor amarelada-vermelha e a eumelanina, de cor preta-marrom. A eumelanina é composta principalmente por dopaquinona (DOPA), 5,6-dihidroxi-indol (DHI) e ácido 5,6-dihidroxi-indol-2-carboxílico (DHICA), enquanto a feomelanina é composta por unidades de benzotiazinas (PROTA, 1992).

Diversas evidências relacionam o surgimento do melanoma à exposição solar (GANDINI *et al.*, 2016; OLSEN *et al.*, 2015 ELWOOD *et al.*, 1985). Entretanto, vários estudos tem investigado a relação da melanina com a tumorigênese e a resistência do melanoma à terapias (RILEY, 1997). Além disso, um dos precursores da eumelanina, o DHICA, tem mostrado uma série de propriedades importantes. Sabe-se que o DHICA é capaz de induzir o aparecimento de quebra da fita do DNA plasmidial e diminuir os reconhecimentos dos danos pela enzima de reparo de DNA de procariotos, a formamidopirimidina-DNA-glicosilase (FPG), em ensaios livres de células (PELLOSI, 2013; PELLOSI *et al.*, 2014). Esse resultado é biologicamente relevante, uma vez as enzimas DNA-glicosilases atuam no reparo do DNA e dessa forma previnem o aparecimento de mutações no código genético. Em humanos, a forma homóloga da FPG é a isoforma  $\alpha$  da OGG1 (8-oxoG DNA N-Glicosilase 1) que, assim como a FPG, também reconhece a 8-oxoguanina pareada a uma citosina. Considerando que o mecanismo de reconhecimento da lesão pelas duas enzimas é ligeiramente diferente (MCKIBBIN *et al.*, 2012), torna-se importante avaliar se o DHICA teria o mesmo efeito sobre a enzima humana. Também foi mostrado que o DHICA é capaz de promover a quebra do DNA plasmidial quando sob radiação ultravioleta B (UVB) (290 a 320nm) (ROUTABOUL *et al.* 1995) e promover quebra de fita simples no DNA sob luz ultravioleta A (UVA) (320 a 400nm) em células e queratinócitos humanos (KIPP; YOUNG, 1999).

Apesar de estes resultados indicarem um papel deletério do DHICA, outros resultados mostraram um efeito favorável ao organismo. No trabalho de ZANG *et al.*, (2000) foi concluído que o DHICA possui excelente propriedade antioxidante como doador de hidrogênio frente a estados excitados reativos (ZANG *et al.*, 2000), além disso, o DHICA foi capaz de diminuir a formação de 8-oxodGuo pela reação de Fenton (PELLOSI, 2013; PELLOSI *et al.*, 2014).

Sendo assim, visando contribuir no entendimento do papel do DHICA em células de melanoma murino e melanócitos, este estudo visou avaliar o efeito do DHICA no reparo do DNA em modelo celular utilizando ensaio cometa e a possível interferência do composto na capacidade de reconhecimento da lesão 8-oxodGuo pela enzima de reparo hOGG1 em ensaios livre de células utilizando DNA plasmidial oxidado por oxigênio molecular singlete.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 MELANOMA

O melanoma é uma neoplasia maligna originada a partir dos melanócitos que são células responsáveis pela pigmentação cutânea. É a primeira causa de morte por doenças da pele, representando cerca de 1% de todos os tumores malignos (BRESSAC-DE-PAILLERETS *et al.*, 2002).

O melanoma representa 10% dos casos de câncer de pele (IVES; STOWE; LORIGAN, 2007) e 80% das mortes por este tipo de tumor (IVES; STOWE; LORIGAN, 2007; MENDES, 2014). É um dos cânceres que pode ser curado se tratado precocemente, porém sua letalidade é alta em casos não tratados ou não diagnosticados em fases iniciais (RHODES *et al.*, 1987; BYROM *et al.*, 2015; LANE *et al.*, 2015).

Já na década de 80, Gallagher *et al.* (1989) afirmavam que a incidência havia aumentado em vários países nos últimos quarenta anos (GALLAGHER; ELWOOD; YANG, 1989), sendo que esta média se manteve em curva crescente conforme dados da *Skin Cancer Foundation*, que verificou um aumento de mais de 50% na incidência somente no período de 1980 à 2004 (SKIN CANCER FOUNDATION, 2014).

Os fatores de risco conhecidos descritos para o melanoma relacionam-se basicamente com características cutâneas e pigmentares, como presença de numerosos nevos, nevos atípicos, sardas, cabelos ruivos, incapacidade de bronzeamento, propensão a queimaduras, existência de lesões pigmentares irregulares, raça caucasiana, histórico de melanoma prévio, relatos familiares, imunodepressão, exposição excessiva a raios ultravioleta (UV) (DEMENAIS *et al.*, 1996; BERWICK; HALPERN, 1997). Existem evidências que pessoas de pele clara possuem maior pré-disposição para desenvolver a doença, isto se baseia nos coeficientes de ocorrência, onde populações negras e amarelas possuem números inferiores (WATERHOUSE *et al.*, 1987).

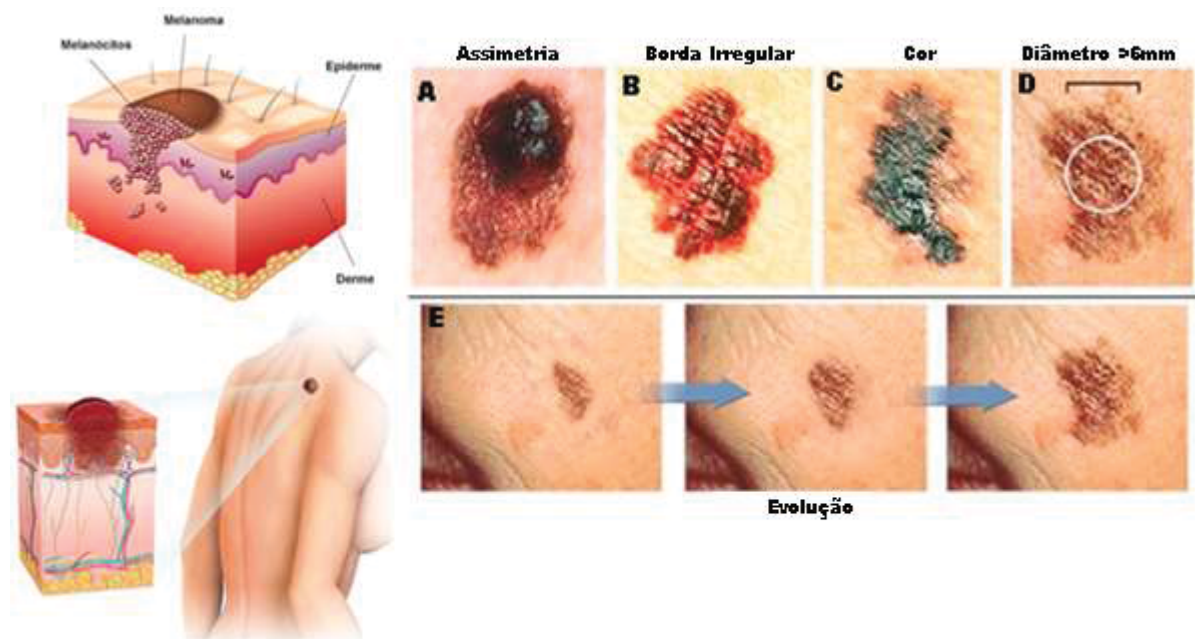
Ao longo de muitos anos, diversos estudos epidemiológicos têm apontado a exposição solar, particularmente durante a infância, como a principal causa ambiental de melanoma (CRIADO; MELO; OLIVEIRA, 2012). Os raios UV, além de facilitar mutações gênicas, exercem efeito supressor no sistema imune cutâneo (GALLAGHER; LEE, 2006). Clinicamente, o melanoma se manifesta geralmente em

indivíduos com idade entre 40 e 60 anos, sendo a média de 57 anos, entretanto, isso não exclui a ocorrência em adolescentes ou idosos (GARBE; BAUER, 2012).

O prognóstico do melanoma pode ser considerado bom se detectado nos estágios iniciais. Nos últimos anos, houve uma grande melhora na sobrevida dos pacientes com esse tipo de câncer, principalmente devido à detecção precoce e quando os índices definidos pelo Grupo Multicêntrico e Multidisciplinar Brasileiro para Estudo do Melanoma (GBM) são favoráveis ao paciente (PINTO *et al.*, 2015; LAKHANI; OLEARNIK; EAYRES, 2003).

Em sua maioria, o melanoma é identificado pelo próprio paciente durante o autoexame da lesão (BRADY *et al.*, 2000; MCPHERSON *et al.*, 2006). Clinicamente a regra do ABCDE auxilia os médicos no diagnóstico do melanoma, onde (A) Assimetria; (B) Borda; (C) Cor; (D) Diâmetro; (E) Evolução (VESTERGAARD *et al.*, 2008) conforme figura abaixo:

**FIGURA 1 – MÉTODOS VISUAIS DE IDENTIFICAÇÃO DO MELANOMA**



FONTE: Disponível em <<http://www.institutonocell.org.br/risco-de-melanoma-cancer-da-pele-e-aumentado-em-80-em-adolescentes/>>, 2015

NOTA: A – Presença de disseminação não circular; B – bordas elevadas com relevos em diferentes níveis; C – Pigmentação disforme ao longo da lesão; D – Diâmetro superior a 6mm; E – Evolução de tamanho da lesão.

Outras formas de identificação não clínicas incluem exames como biópsias da lesão e biópsias de linfonódulos usando exames do material removido cirurgicamente tais como imunohistoquímica (IHQ); hibridização em situ (FISH) e hibridização

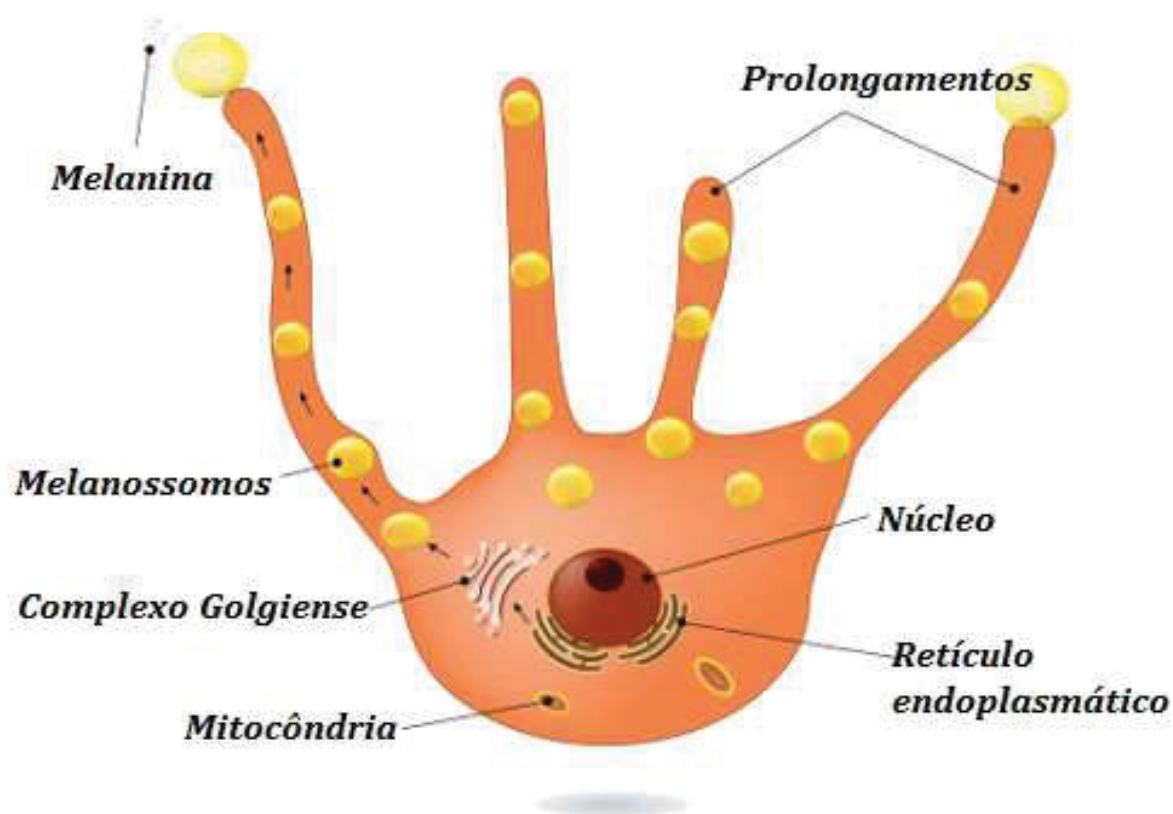
genômica comparativa (CGH) (FERNANDES *et al.*, 2005; SALVIO; MARQUES, 2006; ARGENZIANO *et al.*, 2012).

Os tratamentos existentes são aplicados em função da progressão do melanoma e podem incluir a retirada cirúrgica da lesão, podendo ou não ser vinculada com outros tratamentos à base de quimioterápicos como dacarbazina, temozolomida, fotemustina, cisplatina e paclitaxel ou outras terapias (THOMPSON; SCOLYER; KEFFORD, 2005; BOYLE 2011; SCHADENDORF *et al.*, 2015).

## 2.2 MELANINA

Melanina é um pigmento natural, sendo uma denominação genérica de uma classe de compostos poliméricos derivados da tirosina. A sua produção pode ser observada em superfícies de alimentos como o da maçã, batata e banana expostas ao ar (PAWELEK; KORNER, 1982). A síntese da melanina se inicia pela ação da enzima tirosinase sobre o aminoácido L-tirosina (que por sua vez é derivada da L-fenilalanina). A enzima tirosinase tem sua síntese nos ribossomos das células do melanócitos e depois é transferida pelo retículo endoplasmático até o aparelho de Golgi, onde são armazenadas em vesículas, que mais tarde serão denominadas pré-melanossomas. Estes pré-melanossomas geram os melanossomos que armazenam a melanina após a sua produção. Nesse estágio, o melanossomo passa a ser também denominado de “grânulo de melanina”. No final deste processo, os grânulos de melanina migram pelos prolongamentos dos melanócitos e são transferidos para os queratinócitos epiteliais através de projeções citoplasmáticas conforme demonstrado na Figura 2 (MONTAUDIÉ *et al.*, 2014). Nos queratinócitos a melanina se aloja ao redor do núcleo desempenhando uma função protetora ao DNA face aos raios ultravioletas (UV) (SULAIMON; KITCHELL, 2003).

**FIGURA 2 – DESENHO ESQUEMÁTICO DE UM MELANÓCITO**



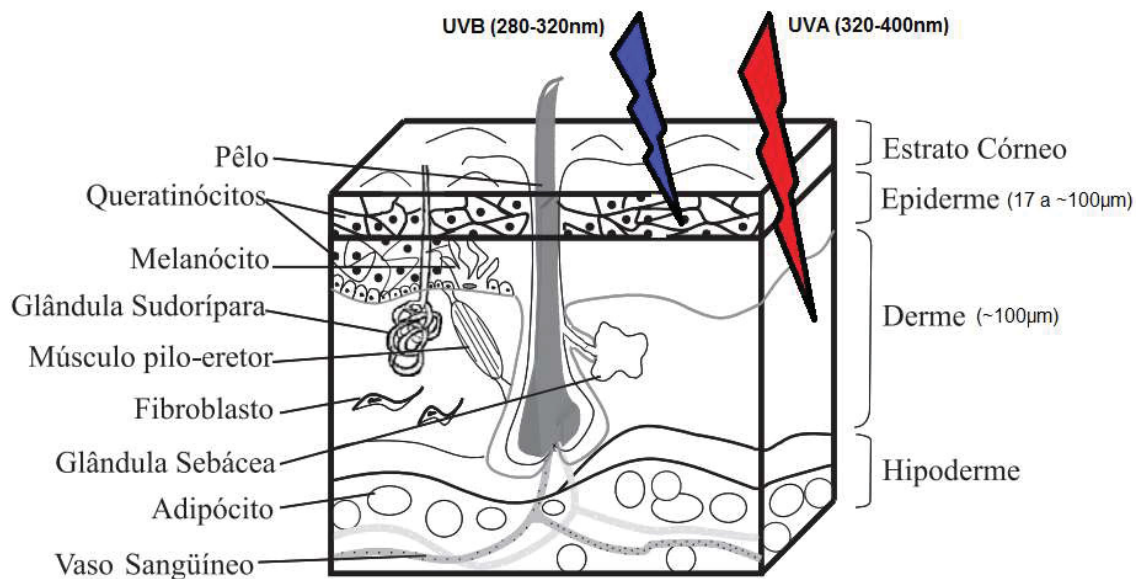
FONTE: Disponível em < <http://biologianet.uol.com.br/histologia-animal/melanina.htm>>, 2015

NOTA: Esquemática explicando a estrutura de um melanócito e a formação de grânulos com compostos melânicos.

A melanina absorve a energia dos raios UV da luz solar e contribui para que eles penetrem menos nas camadas mais internas da pele. O alcance das radiações UVB (290 a 320nm) e UVA (320 a 400nm) da luz solar na pele é diferente. Sendo que a UVA tem maior capacidade de penetração, alcançando células da derme conforme Figura 3 (GONZÁLEZ; FERNÁNDEZ-LORENTE; GILABERTE-CALZADA, 2008). Além disso, a melanina pode agir como antioxidante por captar espécies reativas de oxigênio (ROS) promovendo a sobrevivência celular (DAVIDS; KLEEMANN, 2011).



**FIGURA 3 - ESQUEMA DA PENETRAÇÃO DOS RAIOS UVA E UVB NAS CAMADAS DA PELE**



FONTE: ADAPTADO DE GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007

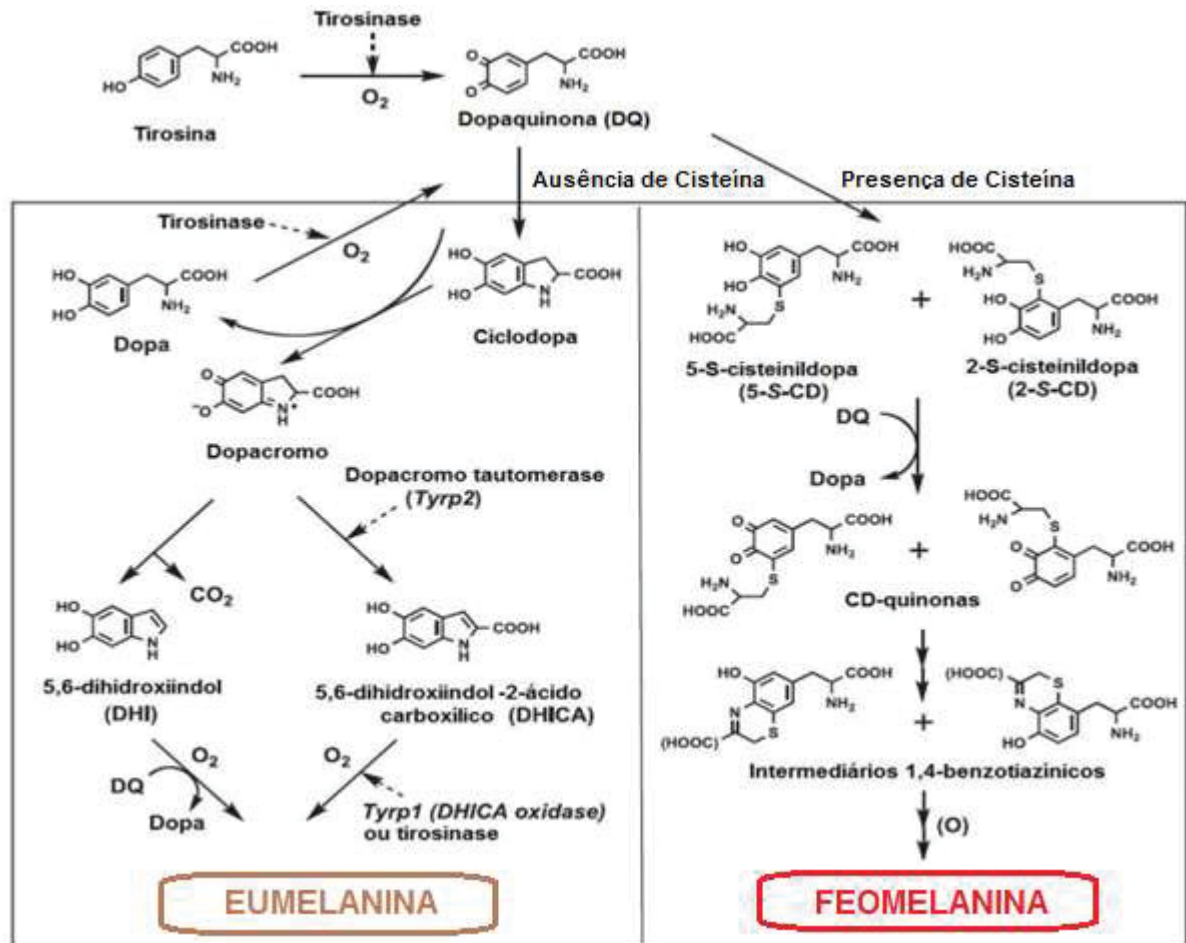
NOTA: Nota-se que a radiação UVA (320-400nm) tem capacidade de atingir as camadas mais profundas chegando a derme ~100  $\mu\text{m}$ . A propriedade dos raios UVA alcançarem mais profundamente torna-se especialmente importante na formação do melanoma.

Um dos primeiros modelos estruturais da melanina foi apresentado por Raper em 1920 através de um experimento com preparo de enzimas com uma espécie de besouro chamado *Tenebrio molitor*, o qual é conhecido popularmente como bicho da farinha, onde se descobriu que na presença de oxigênio, a tirosina é oxidada para dopa e dopaquinona e que após sucessivos processos de oxidação, passa para dopacromo. Além disso, Raper realizou outro experimento baseando-se simplesmente em isolar a vácuo ou na presença de ácido sulfúrico o dopacromo possibilitando assim identificar o DHICA (XAVIER, 2011), concluindo que a melanina é um produto obtido principalmente pela oxidação da DOPA (dopaquinona), DHI (5,6-dihidroxi-indol) e DHICA (ácido 5,6-dihidroxi-indol-2-carboxílico) (RAPER, 1928).

A melanina pode ser de dois tipos: as de coloração preta/marrom e insolúveis chamadas de eumelanina e as alcalino-solúveis de cor amarelada/vermelha chamadas de feomelanina (PROTA, 1992) conforme demonstrado no esquema da melanogênese na Figura 4.



FIGURA 4 - VIAS DE BIOSÍNTESE DAS MELANINAS



FONTE: ADAPTADO DE ITO E WAKAMATSU, 2008

NOTA: Esquemática representando a formação da melanina, com início nos melanócitos ou melanoblastos derivados da Tirosina e seus dois compostos poliméricos (Eumelanina e Feomelanina)

Conforme demonstrado na Figura 4, a enzima **tirosinase** é a enzima requerida para o início da conversão do aminoácido **tirosina** nos biopolímeros da melanina (KORNER; PAWELEK 1982; HEARING; JIMENEZ, 1987). A **dopacromo tautomerase** é enzima pós-tirosinase que possui a habilidade de converter o dopacromo em DHI e DHICA (KORNER; PAWELEK, 1982). O DHICA é composto mais abundante em vesículas em trânsito nos melanócitos (SHIBATA; PROTA; MISHIMA, 1993), além de ser o composto utilizado pela enzima **TRP1** como substrato para oxidação em eumelanina (KOBAYASHI *et al.*, 1994). Porém, o mecanismo enzimático da transformação do DHICA em eumelanina ainda não está claro (WILCZEK; MISHIMA, 1993).

Jiang *et al.* (2010) demonstraram que a inativação da dopacromo tautomerase em ratos expostos a radiações UVA elevam consideravelmente os níveis de espécies reativas de oxigênios (ROS), aumenta a propensão das células a queimaduras

solares/apoptose e diminui a quantidade de eumelanina na epiderme. Além disso, para verificar a interação dos compostos (DHICA e DHI) com o radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) na sua geração através da reação de Fenton, os autores realizaram ensaios com espectroscopia de ressonância de spin eletrônico (ESR), demonstrando que o DHICA possui papel de *scavenger* do radical enquanto que o DHI não (JIANG *et al.*, 2010). Além disso, também foi mostrado que o DHICA tem a capacidade de inibir a peroxidação lipídica (MEMOLI *et al.*, 1997).

O metabólito do DHICA, o ácido 6-hidroxi-5-metoxi-indol-2-carboxílico (6H5MICA) exibe um papel antioxidante tão bom quanto o seu precursor, concluindo que esses compostos exercem papéis muito mais amplos do que simplesmente formação de pigmentos (PANZELLA; NAPOLITANO; D'ISHIA, 2011).

Porém, a melanina ou seu precursor, o DHICA, em presença de radiação UVA ou UVB, induzem o aparecimento de quebra em DNA plasmidial como demonstrado por ROUTABOUL *et al.*, 1995. Eles concluíram que a eficiência do DHICA em promover quebras no DNA sob ação irradiação UV era pouco elevada nas células, uma vez que as concentrações deste composto nas células normais são baixas, não oferecendo riscos significativos a tecidos não neoplásicos. Porém, em casos de melanoma, onde as concentrações de DHICA são mais elevadas devido à alta pigmentação, os seus efeitos deletérios são de importância significativa (ROUTABOUL *et al.*, 1995).

Estudos *in vitro* mostraram que o DHICA tem a capacidade de danificar o material genético aumentando o número de quebras de fita simples em DNA plasmidial, mesmo na ausência de luz UV, porém esta capacidade de dano é perdida quando o DHICA é pré-oxidado pelo oxigênio molecular singlete ( $^1\text{O}_2$ ), provavelmente por agir como um *scavenger* desta espécie e ter sua estrutura modificada (PELLOSI, 2013; PELLOSI *et al.*, 2014). O  $^1\text{O}_2$  pode ser gerado na pele pela exposição a raios UVA e pode ser utilizado como agente de indução de dano celular a partir da fotossensibilização. Nesta situação, obtém-se o  $^1\text{O}_2$  através da troca de energia do fotossensibilizador no estado triplete excitado para o estado triplete fundamental do oxigênio (RIBEIRO *et al.*, 2006).

Além disso, verificou-se também que o DHICA pode interagir com o DNA, afetando a ação da enzima de reparo de DNA, a formamidopirimidina-DNA-glicosilase (Fpg), o que diminuí a sua capacidade de reconhecimento de lesões no DNA em aproximadamente 50% (PELLOSI, 2013; PELLOSI *et al.*, 2014).

## 2.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DANOS AO DNA

Radicais livres tiveram seus primeiros estudos no início do século XX a partir de estudos envolvendo a decomposição do hexafeniletano sendo seus resultados tendo maior importância a partir da década de 40 diante do descobrimento de técnicas de detecção (RIBEIRO, *et al.*, 2006).

Segundo Halliwell e colaboradores, o termo radical livre trata-se de uma espécie que tem um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984) sendo estas funções atribuídas aos átomos de hidrogênio, oxigênio e metais de transição em sua grande maioria. Já o termo espécies reativas de oxigênio, não necessariamente engloba moléculas com elétrons desemparelhados, o que as caracterizariam como radicais livres, mais também outras moléculas de reatividade variável em decorrência de sua estabilidade.

As principais Espécies Reativas de Oxigênio são demonstradas na tabela a seguir:

**TABELA 1 - PRINCIPAIS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO COM FORMAÇÃO *IN VIVO***

ROS	Exemplos de formação	Exemplos de local de formação
Radical Superóxido ( $O_2^-$ )	Redução do oxigênio molecular por 1 elétron	Reações de autooxidação a partir de flavoproteínas e ciclos redox.
Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ )	Enzimática	Vias catalisadas por oxidases e pela superóxido dismutase.
Radical Hidroxila ( $HO^\bullet$ )	Reações de Fenton e Haber-Weiss catalisadas por metais	Locais adjacentes de formação de Superóxido/peróxido de hidrogênio na presença de metais, em especial ferro, ou produtos de reação do óxido nítrico com o radical superóxido.
Radical Alcoxila ( $RO^\bullet$ )	Radical orgânico centrado no oxigênio	Intermediário da peroxidação lipídica.
Radical Peroxila ( $ROO^\bullet$ )	A partir da formação de hidroperóxidos orgânicos	Intermediário da peroxidação lipídica.
Oxigênio Molecular Singlete ( $^1\Delta_g O_2$ )	Primeiro estado excitado do Oxigênio Molecular com nível de energia de 22kcal/mol acima do estado fundamental.	Não há sítios celulares definidos.

FONTE: Adaptado de RIBEIRO *et al.*, 2006

Devemos observar que as espécies reativas de oxigênio podem se combinar com outros átomos e formar novas espécies tais como o óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ) o qual pode reagir com outras ROS formando o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (CARRERAS *et al.*, 2002). O oxigênio em seu estado fundamental possui dois elétrons com spins paralelos os quais ocupam dois orbitais  $\pi^*$  com a mesma energia que chamamos de estado triplete ( $^3\Sigma_g^-$ ) (RONSEIN *et al.*, 2006). A sua produção pode ser a partir de metabolismo celular, inflamação ou exposição a diversos agentes tanto físicos como químicos. Um dos componentes físicos mais estudados é a exposição a raios UVA. Uma das formas existentes do oxigênio no estado excitado é a forma singlete ( $^1\Delta_g$ ) onde a mesma é gerada a partir de um acréscimo de energia, tornando-a mais reativa e oxidante do que o estado fundamental.

**TABELA 2 - ORBITAIS MOLECULARES DO OXIGÊNIO SINGLETE E DO SEU ESTADO FUNDAMENTAL TRIPLETE**

Estado	Orbitais $\pi^*$	Energia (kcal/mol)	Tempo de vida (s)
$^1\Sigma_g^+$	$\uparrow \quad \downarrow$	37,5	$10^{-11}$
$^1\Delta_g$	$\uparrow\downarrow \quad \uparrow$	22,5	$10^{-6}$
$^3\Sigma_g^-$	$\uparrow \quad \uparrow$		

FONTE: RONSEIN *et al.*, 2006

Devido a regra de restrição de spin não é permitido que o  $\text{O}_2$  em seu estado fundamental receba um par de elétrons com spins antiparalelos. Por outro lado, o  $^1\text{O}_2$  não se aplica a restrição por possuir um orbital  $\pi^*$  vazio, isto faz que o possua grande eletrofacilidade permitindo interações com moléculas de alta densidade eletrônica. No meio biológico, proteínas, lipídeos e DNA sabidamente são moléculas ricas em elétrons, sendo portanto alvos de grande importância para o  $^1\text{O}_2$  (MARTINEZ *et al.*, 1999). Em meio biológico, o  $^1\text{O}_2$  forma-se a partir de reações com peróxido de hidrogênio (DI MASCIIO *et al.*, 1994), peroxinitrito (HELD; HALKO; HURST, 1978), termodecomposição (BRIVIDA *et al.*, 1996), enzimas (KANOFISKY, 1983) e mecanismos de defesa como fagocitose (STEINBECK *et al.*, 1992).

Devido a estas características, o  $^1\text{O}_2$  pode ser utilizado como mecanismo de indução de dano ao DNA a partir da fotossensibilização. Nesta situação obtém-se o  $^1\text{O}_2$  através da transferência de energia do fotossensibilizador no estado triplete excitado para o estado triplete fundamental do oxigênio. Como o tempo de vida do  $^1\text{O}_2$  é muito curto ( $\sim 2\mu\text{s}$ ), este age somente no seu sitio de formação, fazendo com que

moléculas do fotossensibilizador não ligadas às células/moléculas alvo não sejam afetadas (RIBEIRO *et al.*, 2006).

Um desses fotossensibilizadores é o Rosa Bengala (RB) que começou a ser utilizado para tratamento do crescimento excessivo de algas na água e para degradação de pesticidas fosforados (FOOTE; PETERS, 1971). Nos dias atuais, a destruição fotodinâmica de tumores propõe resultados promissores justificando novas pesquisas sobre suas atividades biológicas.

Quando o suprimento de oxigênio se eleva a concentrações maiores do que as normais encontradas no ar atmosférico pode haver danos nos tecidos e organismo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984). O DNA é constantemente lesionado por diversos tipos de ROS, entre eles o  $^1\text{O}_2$  (CADET; TREOULE, 1978). O  $^1\text{O}_2$  é a principal espécie reativa associada com reações de oxidação mediadas por UVA, agindo exclusivamente sobre a guanina (CADET *et al.*, 2003). O dano ao DNA é de relevância devido ao fato do seu papel no armazenamento de informações e hereditariedade. O principal dano gerado pela ação do  $^1\text{O}_2$  é o 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo), que pode ocasionar mutações (AGNEZ-LIMA *et al.*, 2001).

Os organismos procarióticos e eucarióticos detêm diversos mecanismos de reparo do DNA para evitar que possíveis lesões venham a levar a alterações genéticas. Entre os principais mecanismos destacamos: reparo por excisão de nucleotídeo (NER), reparo por erro de pareamento (MMR), reparo de quebra de fita simples (SSBR), reparo de quebra de fita dupla (DSBR), reparo direto, reparo por recombinação, reparo por excisão de bases (BER) (FRIEDBERG *et al.*, 2005)

No caso de lesões oxidativas, o BER é a forma de reparo mais relevante, uma vez que sua via atua em danos com mesmo tamanho e forma das biomoléculas originais. Primeiramente há o reconhecimento das lesões pelas DNA glicosilases. As glicosilases monofuncionais possibilitam a hidrólise da ligação *N*-glicosídica entre a 2'-desoxirribose e a base modificada, isto faz com que a base diferente seja liberada e o sítio torne-se abásico (AP). Como via paralela, as enzimas bifuncionais também removem as bases oxidadas além de clivar os sítios abásicos por beta-eliminação (eliminação do fosfato 3') gerando uma quebra nas fitas e subsequente uma lacuna (*gap*) de uma base com terminações 5'-fosfato e 3'-fosfato- $\alpha$ - $\beta$ -aldeído insaturado. A partir disso, o rumo do reparo dependerá de qual *N*-glicosilase atuou, sendo que caso tenha sido uma monofuncional, a próxima etapa terá a ação em uma enzima AP endonuclease que cliva o esqueleto do DNA logo após o sítio AP. Caso a enzima seja bifuncional, gera-se um sítio abásico flanqueado por fosfatos, sendo necessário a

remoção do fosfato em 3' possibilitando a atuação das DNA polimerases (POL $\beta$ ) (via curta), ou POL  $\delta$ / POL $\epsilon$  + cofatores RFC (fator de replicação C) e PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) caracterizando assim a via longa (FRIEDBERG *et al.*, 2005; BAUTE; DEPICKER, 2008).

Em algumas situações, a oxidação das bases pode ocasionar a quebra direta das fitas de DNA (BURROWS; MULLER, 1998). Alguns ensaios visam avaliar este tipo de situação, entre eles: ensaios de incisão em DNA circular (mede a conversão de DNA supernovelado em circular aberto) e Ensaio Cometa. O princípio do Ensaio Cometa consiste em avaliar quebras no DNA de uma célula individual por migração em gel de agarose, pois a observação do resultado em microscópio revela-se com forma similar a um cometa, com a cauda correspondendo aos fragmentos do DNA que migram (DI PAOLO, 2006). Porém, somente o Ensaio Cometa é capaz de realizar a detecção de baixas quantidades de danos, uma vez que os outros se mostram não sensíveis (COLLINS *et al.*, 2001), além disso, pode ser modificado para utilização conjunta com enzimas de reparo para detectar as oxidações de bases que não levam diretamente à quebra.

A utilização de enzimas de reparo é uma alternativa para ensaios que não possuem capacidade de evidenciar diretamente os danos oxidativos em bases. Tratamentos que envolvam DNA glicosilases, tal como a hOGG1, podem fornecer resultados indicando a presença de 8-oxodGuo. Pois há o aumento da quebra das fitas do DNA após sua adição, isso porque em sistemas celulares, existem todas as enzimas e compostos necessários para o reparo, porém em sistemas livres de células não há.

A Tabela 3 demonstra as principais enzimas de reparo que atuam na lesão produto da oxidação do DNA por  $^1\text{O}_2$ , a 8-oxodGuo.

**TABELA 3 - SUBSTRATOS DAS DNA GLICOSILASES, CLASSIFICAÇÃO E OCORRÊNCIA EM DIFERENTES ORGANISMOS**

<b>Acrônimo</b>	<b>DNA glicosilase</b>	<b>Substrato<sup>d</sup></b>	<b>Organismos</b>
MutY/MUTYH	MutY/MUTYH <sup>a</sup>	8-oxoG:A, G:A>>C:A, 2-OH-A	Bactérias, vertebrados
OGG1	8-oxoG DNA glicosilase 1 <sup>a</sup>	8-oxoG:C, FapyG:C>>8-oxoG:T>8oxoG:G	Vertebrados, plantas, Archaea
Fpg/MutM	Formamidopirimidina DNA glicosilase <sup>a</sup>	8-oxoG:C, FapyG, FapyA, 5-OH-C, 5-OH-U, Tg, 5-ForU	Bactérias, plantas
Nei/NEIL	Endonuclease VIII <sup>a</sup>	8-oxoG, Tg, Ug, 5-OH-C, 5-OH-U, FapyG, FapyA, DMDM-idantoina, espiroiminoidantoina	Bactérias, vertebrados

FONTE: Adaptado de BAUTE e DEPICKER, 2008

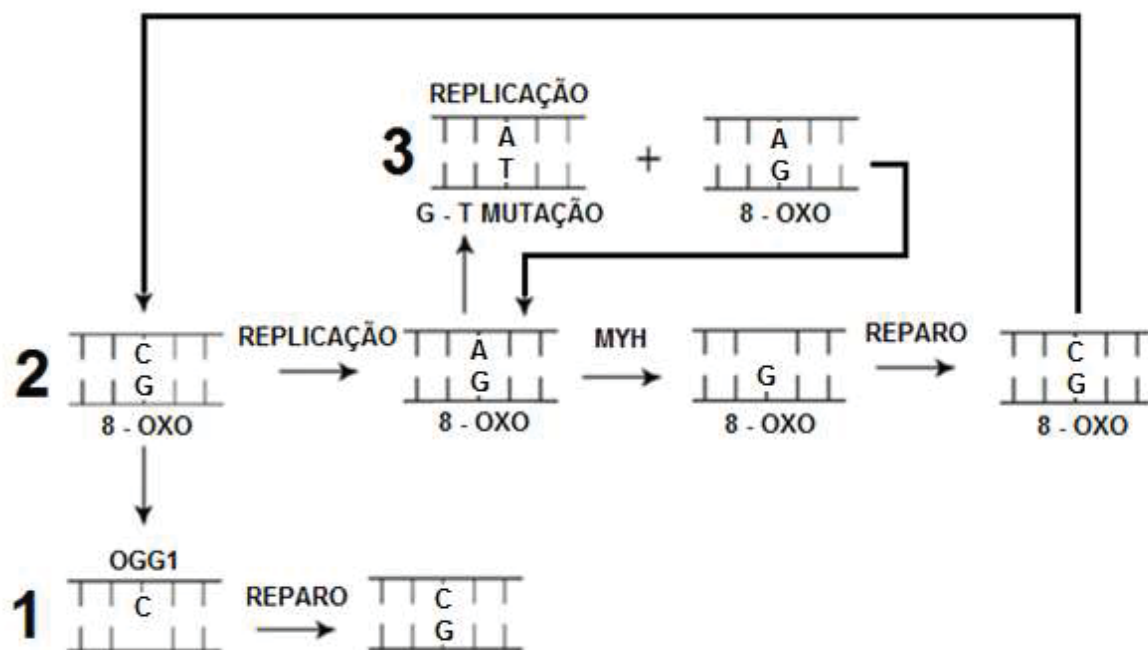
NOTA: <sup>a</sup>Glicosilases bifuncionais.

<sup>d</sup>Abreviações: 8-oxoG, 7,8-dihidro-8-guanina; 2-OH-A, 2-hidroxiadenina; FapyG, 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina, FapyA, 4,6-diamino-5-formamidopirimidina; 5-OH-C, 5-hidroxicitosina; 5-OH-U, 5-hidroxiuracil; Tg, timinaglicol; 5-ForU, 5-formiluracil; Ug, Uracilglicol;

Em casos de falhas no reparo das lesões oxidativas com posterior replicação do DNA, pode haver o pareamento incorreto da 8-oxodGuo com a adenina. Nesta situação, uma segunda via de excisão de base utiliza a MYH glicosilase (MUTYH), para reconhecer adeninas pareadas erroneamente com lesões 8-oxodGuo (SVILAR *et al.*, 2011; BAUTE; DEPICKER, 2008). Se não for reparada nesta etapa, pode ocasionar mutações no próximo ciclo de replicação como demonstrado na figura 5.



**FIGURA 5 - MECANISMOS DE AÇÃO DAS ENZIMAS REPARADORAS OGG1 E MYH**



FONTE: O autor, (2016)

NOTA: 1 - Reparo via OGG1. 2 – na ausência de reparo via OGG1 a DNA polimerase age inserindo uma adenina para parear com a 8-oxoG. Esta adenina incorporada de forma errada é reparada pela enzima MYH. 3 – Na ausência de reparo antes da próxima replicação, pode haver uma mutação onde o par G-C pode tornar-se T-A.

Em caso de falha no reparo do DNA, uma célula pode desenvolver tolerância às modificações (podendo causar alterações cromossômicas) ou desencadear morte celular por apoptose, necrose ou autofagia (KULTZ, 2005). Entre os danos que desencadeiam a apoptose estão incluídos os danos volumosos ou oxidação da guanina pela radiação UV (DUNKERN; FRITZ; KAINA, 2001); O<sup>6</sup>-metilguanina e bases N-metiladas induzidas por agentes alquilantes (SOBOL *et al.*, 1996; IZUMI *et al.*, 2005) e outros adutos como o N<sup>2</sup>-benzo-pireno (N<sup>2</sup>-BP) formado pela exposição à fumaça do cigarro (SOLHAUG *et al.*, 2004).

O estudo dos mecanismos de reparo, assim como suas falhas são de particular importância já que diversos autores relataram desordens decorrentes no mau funcionamento destas funções. Xie *et al.*, (2004) demonstram que deficiências na OGG1 em ratos aumenta a predisponibilidade a tumores em aproximadamente 65%, sendo os órgãos mais acometidos o pulmão e ovários (XIE *et al.*, 2004). Minowa *et al.*, (2000) demonstraram o papel essencial da OGG1 no reparo da 8-oxoG em ratos, uma vez que a sua ausência no processo de reparo aumentou o acúmulo de 8-oxoG



elevando a presença de adutos no fígado produzidos por espécies reativas de oxigênio (ROS) (MINOWA *et al.*, 2000). McKinnon (2009) mostrou a importância de se entender como problemas no reparo do DNA afetam o sistema nervoso, fornecendo uma base racional para terapias orientadas melhorando os problemas neurológicos em síndromes como Parkinson e Alzheimer (MCKINNON, 2009).

No campo de estudo relacionado especificamente ao melanoma, o DNA possui um papel fundamental na manutenção da integridade genômica, sendo que o declínio destas propriedades aumentam significativamente o risco de câncer, incluindo o melanoma cutâneo (BERWICK; VINIES, 2000). Uma grande variedade de alterações genéticas somáticas ocorrem no melanoma maligno, incluindo mutações relacionadas à exposição aos raios UV (CHIN, 2003). Estudos prévios demonstraram uma associação individual entre a capacidade de reparo do DNA e o risco de melanoma (BERWICK; VINIES, 2000; NEUMANN; STURGIS; WEI, 2005). Wei *et al.*, (2003) em seus estudos com linfócitos provenientes de pacientes com melanoma demonstraram que estes pacientes possuem uma significativa redução na capacidade de reparo em comparação com pessoas normais (WEI *et al.*, 2003). Landi *et al.*, também em seus estudos com linfócitos de pacientes com melanoma verificaram a redução da capacidade de reparo do DNA em pacientes com nevos displásicos e baixa capacidade de bronzeamento (LANDI *et al.*, 2002). Hauser *et al.*, (2006) e Debniak *et al.*, (2006) reportaram que existe uma associação no polimorfismo do gene receptor de Melancortina 1 (receptor do hormônio melancortina), e a redução da capacidade de reparo do DNA promovendo uma possibilidade de aumento no aparecimento do melanoma (HAUSER *et al.*, 2006; DEBNIK *et al.*, 2006). Estudos relacionados ao gene XPD e o aumento do risco de melanoma tem sido reportado por diversos autores (WINSEY *et al.*, 2000; TOMESCU *et al.*, 2001; BACCARELLI *et al.*, 2004; BLANKENBURG *et al.*, 2005; HAN *et al.*, 2005). Outra linha de pesquisa refere-se ao reparo de erro de pareamento (MMR) em mutações nos genes que realizam este procedimento, sendo que em caso de comprometimento deste sistema de reparo, existe uma probabilidade de aumento nos riscos de câncer incluindo o melanoma (MELLON; CHAMPE, 1996; MELLON *et al.*, 1996). A exposição solar é considerada como um fator de risco ambiental amplamente crítica para a ocorrência do melanoma. A compreensão subjacente à base genética do melanoma é uma questão fundamental para desenvolver estratégias de proteção e terapias contra este tipo de câncer, sendo que questões relativas a radiação UV e mecanismos de indução e reparo de dano ao

DNA são sem dúvida o grande alvo, além disso, quando os mecanismos de danos ao DNA são prejudicados, diversas doenças podem ocorrer (FRIEDBERG *et al.*, 2005).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se o ácido 5,6-dihidroxi-indol-2-carboxílico (DHICA) é capaz de suprimir o reparo de DNA em células produtoras de melanina (melanoma murino B16-F10 e melanócitos Melan-A) que sofreram danos causados pela ação do oxigênio molecular singlete ( $^1\text{O}_2$ ) ou se o DHICA afeta a ação da enzima de reparo DNA glicosilase hOGG1 em ensaios livres de células usando plasmídeo pUC18 oxidado pelo  $^1\text{O}_2$ .

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para o cumprimento do objetivo geral, este trabalho teve os seguintes objetivos específicos:

- a) Avaliar a viabilidade celular das linhagens de melanoma murino B16-F10 e melanócitos Melan-A tratadas com DHICA, após tratamento com Rosa Bengala Acetato e Irradiação (RBAC-PDT).
- b) Avaliar a capacidade de reparo do DNA na presença de DHICA das linhagens de melanoma murino B16-F10 e melanócitos Melan-A tratadas com  $^1\text{O}_2$  como agente indutor de dano ao DNA utilizando o ensaio Cometa.
- c) Avaliar o reconhecimento dos danos oxidativos gerados pelo  $^1\text{O}_2$  no plasmídeo pUC18 pela enzima hOGG1 na presença do DHICA.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 REAGENTES

O ácido-5,6-dihidroxi-indol-2-carboxílico (DHICA) foi sintetizado segundo Charkoudian *et al.*, (2006) pela professora Dra. Daniela de Luna Martins do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense (UFF), Rio de Janeiro – RJ (CHARKOUDIAN; FRANZ, 2006). O Rosa Bengala Acetato (RBAC) foi sintetizado segundo Bottiroli *et al.*, (1997) pela Dra. Andreia Akemi Suzukawa do Instituto Carlos Chagas/Fundação Oswaldo Cruz (ICC/Fiocruz) Curitiba – PR (BOTTIROLI *et al.*, 1997). O plasmídeo pUC18 foi obtido comercialmente da Thermo Scientific e a enzima de reparo OGG1 (isoforma  $\alpha$  humana) foi obtida da New England Biolabs (Acton, MA).

A solução salina-fosfato tamponada (PBS) foi preparada como solução estoque concentrada 10x. Conteúdo da solução: NaCl 680 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 13,4 mmol.L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 40,5 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,5). Esterilizada em autoclave (120°C, 45 minutos, 1 atm), e para o uso foi diluída com água ultrapura.

Solução de tripsina-EDTA foi preparada a partir de NaCl 137 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 5,4 mmol.L<sup>-1</sup>, glucose 5 mmol.L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,42 mmol.L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,44 mmol.L<sup>-1</sup>, NaHCO<sub>3</sub> 2,3 mmol.L<sup>-1</sup>, EDTA 0,53 mmol.L<sup>-1</sup>, 0,05 % (m/v) tripsina (1:250) e 0,002% (m/v) de vermelho de fenol, sendo o pH ajustado entre 7,2 e 7,4 com NaHCO<sub>3</sub>. A solução foi esterilizada por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22  $\mu$ m (Millipore®).

A solução salina balanceada de Hanks (HBSS) foi preparada a partir de duas soluções: solução (A) composta de NaCl 2,73 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 107 mmol.L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 25 mmol.L<sup>-1</sup> e MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 27 mmol.L<sup>-1</sup>, e solução (B) constituída de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,5 mmol.L<sup>-1</sup> e glucose 110 mmol.L<sup>-1</sup>. Estas soluções foram mantidas a 4°C até o momento do uso, quando foram misturadas (1:1) e diluídas (10x) com água ultrapura.

O tampão fosfato foi preparado a partir de 0,47 mmol.L<sup>-1</sup> de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,53 mmol.L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. O pH foi ajustado para 7,0 e a solução foi mantida a 4°C estável por até um mês.

A solução de Citrato de Sódio em meio alcoólico foi preparada a partir de citrato de sódio 2,84 mmol.L<sup>-1</sup> diluído em álcool etílico 50%.

Solução de brometo de Etídeo PlusOne™ obtida da GE Health Care Amersham Biosciences. Para coloração do gel de agarose, foi preparada uma solução contendo 0,02  $\mu$ L/mL diluída em água destilada. Solução MMS 30  $\mu$ g/mL preparada em meio

de cultura. Solução FSUDS preparado a partir de azul de bromofenol 0,25% (p/v), xileno cianol 0,25% (p/v), Ficoll 25% (p/v), SDS 0,5% (p/v), Tris-HCl 10 mmol.L<sup>-1</sup> pH 8,0 e EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup> pH 8,0.

A água ultrapura foi obtida a partir de um sistema purificador Master System P&D (GEHAKA-São Paulo, SP). A agarose foi adquirida da Agargen (Brasil). Os leitores de microplacas utilizados são da marca Tecan Infinite® 2000 e Epoch™ ambos da Biotek.

Como tampão para diluição da enzima hOGG1, foram utilizados duas diferentes formulações, sendo uma comercial conforme kit (utilizada para o ensaio plasmídeo) e outra adaptada (utilizada para ensaio cometa) conforme tabela a seguir:

**TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DOS TAMPÕES UTILIZADOS PARA A ENZIMA HOGG1 EM DIFERENTES ENSAIOS**

	NaCl	Tris-HCl	MgCl <sub>2</sub>	DTT	HEPES	KCl	EDTA	BSA	pH
Comercial	50mM	10mM	10mM	1mM	-	-	-	-	7,9
Adaptado	-	-	-	-	40mM	0,1M	0,5mM	0,2mg/dl	8,0

FONTE: O AUTOR (2016).

NOTA: A composição do tampão foi alterada em relação a comercial para adequação do Ensaio Cometa, a fim de evitar interferências do tampão na corrida eletroforética.

## 4.2 LIMPEZA E ESTERILIZAÇÃO DOS MATERIAIS

Os procedimentos com as células foram realizados em capela de fluxo laminar vertical (VECO), previamente desinfetada com álcool 70% e irradiada sob lâmpada UV por no mínimo 15 minutos. Todo material de vidro/plástico utilizado para os procedimentos de cultivo celular (frascos de vidro para armazenamento de soluções, equipamento para filtração sob pressão, tampas, pipetas de vidro, microtubos e ponteiros de pipetas automáticas) foram limpos com detergente extran (detergente catiônico acrescido de hipoclorito de sódio) e enxaguados diversas vezes em água destilada. Os materiais foram esterilizados em autoclave a 120°C por 45 minutos, a 1 atm. Materiais plásticos não autoclaváveis foram esterilizados em Micro-ondas (Electrolux MEX55) em potência média por 50 minutos.

#### 4.3 CULTIVO CELULAR

As linhagens utilizadas neste trabalho (Melan-A e B16-F10) são provenientes de alíquotas armazenadas no laboratório, as quais foram originalmente cedidas pelo Professor Dr. Roger Chammas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP). Essas linhagens foram obtidas de camundongos C57BL/6, onde a linhagem Melan-A é proveniente de células de melanócitos e a linhagem B16-F10 de melanoma metastático.

As células foram cultivadas em garrafas estéreis com meio de cultivo celular RPMI 1640, obtido comercialmente da Cultiab (Campinas-SP), e suplementado com soro fetal bovino (SFB) 7,5% da Gibco® (Thermo Scientific), e antibiótico Gentamicina (Sigma) 50 µg/mL. O meio comercial em pó foi reconstituído em água ultrapura e esterilizado por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 µm (Millipore®) sob pressão em aparelho Sartorius (SARTORIUS, 2015), também foram adicionados 20 mmol.L<sup>-1</sup> de ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfônico (HEPES) e 8 mmol.L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub>. Adicionalmente para a linhagem Melan-A foi acrescentado *Phorbol-12-myristate-13-acetate* (PMA) 200 mM. Os cultivos foram mantidos em estufa de CO<sub>2</sub> (Sanyo), em atmosfera contendo 5,0% de CO<sub>2</sub>, com umidade aproximada de 95% e temperatura constante de 37°C. Ao atingir 80-90% de confluência as células sofreram repiques, para isso as culturas foram previamente lavadas com solução PBS 1x e foram destacadas da garrafa com solução de tripsina-EDTA (1 mL para garrafa de 25 cm<sup>2</sup>) por 5 min. Após a tripsinização, foi adicionado 1 mL de meio e a suspensão celular foi coletada e 1 mL foram transferidos para nova garrafa e 11 mL de meio foi adicionado. Para congelamento e armazenamento das linhagens, as células foram suspensas em meio acrescido de DMSO 10% (v/v), e congeladas em freezer Sanyo a -80°C.

#### 4.4 PLAQUEAMENTO

Para o plaqueamento celular, primeiramente as culturas foram previamente lavadas com solução PBS 1x e foram destacadas da garrafa com solução de tripsina-EDTA (2 mL para garrafa de 75 cm<sup>2</sup>) por 5 min. Após a tripsinização, foi adicionado 2 mL de meio e a suspensão celular foi coletada. A concentração celular foi medida por meio de contagem em câmara de Neubauer. Após diluição, as células foram plaqueadas de acordo com o experimento conforme tabela a seguir:

**TABELA 5 - TIPOS DE PLACAS UTILIZADAS POR EXPERIMENTO E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES CELULARES PLAQUEADAS.**

Experimento	Tipo de placa	[ ] de células/poço
Viabilidade Celular	96 poços	5x10 <sup>3</sup>
Ensaio Cometa	24 poços	1x10 <sup>5</sup>

FONTE: O AUTOR (2016)

#### 4.5 FOTOSSENSIBILIZAÇÃO E INCUBAÇÃO COM DHICA

A fotossensibilização foi utilizada com o intuito de gerar espécies reativas de oxigênio, mais especificamente o <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Para isso, foi utilizado o corante Rosa Bengala acetato (RBAC), que após internalização pelas células, sofre ação das esterases e gera o Rosa Bengala (RB). Para as soluções de DNA, foi usado o RB diretamente. O RB absorve luz visível e transfere a energia de excitação para a molécula de oxigênio presente no meio reacional. Esta transferência de energia faz com que haja a transformação do O<sub>2</sub> em <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Para o procedimento utilizou-se uma câmara de LED no comprimento de onda de 526 nm (verde) onde as placas contendo células ou solução de DNA foram irradiadas. A câmara foi construída por Suzukawa (2012). As concentrações e tempos de exposição do RBAC e RB foram utilizados conforme tabela 6.

**TABELA 6 - CONCENTRAÇÃO E TEMPO DE EXPOSIÇÃO DAS DIFERENTES FORMAS DE ROSA BENGALA UTILIZADOS**

Fotossensibilizador	Ensaio	Concentração [ ]	Exposição
Rosa Bengala Acetato (RBAc)	Viabilidade/Cometa	5 µg/mL	15 min
Rosa Bengala (RB)	Plasmídeo	10 µM	90 min

FONTE: O AUTOR (2016)

NOTA: Conforme Bottiroli *et al.*, (1997) a acetilação do Rosa Bengala aumenta seu caráter hidrofóbico, aumentando/forçando a captação celular do composto em até 10 vezes, quando comparado à forma não acetilada (BOTTIROLI *et al.*, 1997).

A incubação com o composto DHICA foi realizada de diferentes formas conforme o experimento realizado. As concentrações utilizadas e o tempo de incubação estão descritas na tabela 7 (abaixo), onde para o ensaio de viabilidade celular e Ensaio Cometa o DHICA foi incubado em meio de cultura e para os ensaios com plasmídeo o DHICA foi incubado diretamente com o DNA em uma microplaca sob agitação em Shaker 250 rpm à 37°C.

**TABELA 7 - CONCENTRAÇÃO E TEMPO DE EXPOSIÇÃO DO DHICA PARA OS DIFERENTES ENSAIOS REALIZADOS**

Ensaio	Concentração [ ]	Incubação
Viabilidade Celular ou Ensaio Cometa	150µM	18 horas
Ensaio Plasmidial	2mM	5 minutos

FONTE: O AUTOR (2016)

#### 4.6 VIABILIDADE CELULAR

Células das linhagens B16-F10 e Melan-A foram cultivadas conforme item 4.3 e posteriormente plaqueadas em placas 96 poços conforme item 4.4. Após aderência por 24h, retirou-se o meio de cultivo e adicionou-se RBAc 5 µg/mL. As células foram mantidas sob incubação à 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por duas horas para internalização celular do RBAc. Decorrido este tempo, o sobrenadante foi retirado e adicionou-se solução HBSS 1x, sendo a placa imediatamente levada para irradiação conforme descrito no item 4.5. Após os procedimentos de irradiação, a viabilidade foi avaliada pelas metodologias de MTT e Cristal Violeta (Itens 4.6.1 e 4.6.2, respectivamente) no tempo 18 horas após irradiação, sendo neste caso introduzido o grupo com DHICA 150 µM). Cada experimento foi realizado em quadruplicata.



#### 4.6.1 Ensaio MTT

A viabilidade celular pelo método do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) foi realizada de acordo com Reilly *et al.*, (1998). O princípio do método baseia-se no fato de células viáveis e metabolicamente ativas reduzirem sais de tetrazólio formando cristais de formazan solúveis em DMSO (REILLY *et al.*, 1998). Após os respectivos tratamentos, o meio de cultura das células foi substituído pela solução de MTT (0,5 mg/mL em HBSS) e manteve-se a placa em incubação por 3 horas na estufa de CO<sub>2</sub> sendo posteriormente descartado o sobrenadante e adicionado o DMSO. Cada poço foi homogeneizado e a leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas (*TECAN Infinite 2000*) à 550nm e o branco considerando o solvente DMSO. Os resultados foram calculados e normalizados a partir do controle.

#### 4.6.2 Ensaio Cristal Violeta

A viabilidade celular pelo método do Cristal Violeta (CV) foi realizada de acordo com Gillies *et al.*, (1986). Segundo os autores o cristal violeta cora ácidos nucleicos das células aderidas e fixadas (GILLIES; DIDIER; DENTON, 1986). Após os respectivos tratamentos, as células foram lavadas com solução PBS 1x, sendo fixadas posteriormente com metanol 100% pelo período de 10 minutos. Após o tempo de fixação, o metanol foi retirado e adicionou-se solução de cristal violeta 0,2% diluída em etanol 2%, durante 3 minutos. Decorrido o tempo, o corante foi retirado e os poços lavados cuidadosamente com solução PBS 1x por 10 vezes. Após a lavagem, o corante foi eluído com solução de citrato de sódio 0,05 mol/L em etanol 50% durante 10 minutos (GILLIES; DIDIER; DENTON, 1986). A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas (*TECAN Infinite 2000*) à 540nm e o branco considerando o Citrato de Sódio. Os resultados foram calculados e normalizados a partir do controle.

#### 4.7 ENSAIO COMETA

A avaliação de danos no DNA foi realizada empregando dois protocolos do Ensaio Cometa, como segue: versão alcalina (TICE *et al.*, 2000; LEME *et al.*, 2014) (denominada clássica) e versão alcalina modificada pela emprego de endonucleases de reparo (enzima hOGG1) para detecção de bases oxidadas (denominada oxidativa).

Células das linhagens B16-F10 e Melan-A foram cultivadas conforme item 4.3 e posteriormente plaqueadas em placas 24 poços conforme item 4.4. Após aderência por 24 h, retirou-se o meio de cultivo e adicionou-se RBAC 5 µg/mL. As células foram mantidas sob incubação à 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por duas horas para internalização celular do RBAC. Decorrido este tempo, o sobrenadante foi retirado e adicionou-se solução HBSS 1x, sendo a placa imediatamente levada para irradiação conforme descrito no item 4.5. Após os procedimentos de irradiação, os danos no DNA foram avaliados pelo Ensaio Cometa no tempo 0 h e 18 h após a irradiação, sendo neste caso introduzido o grupo com DHICA (150 µM).

Após cada tempo estabelecido as células foram lavadas nos respectivos poços com PBS 1x e incubadas por 5 minutos com solução Tripsina-EDTA para desaderência. Para inativação da tripsina, adicionou-se igual quantidade de meio de cultura. Na sequência, a suspensão celular foi transferida para um microtubo de 2 mL e centrifugada em 240g por 5 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* de células utilizado para produção das lâminas. Em todos os grupos, para cada suspensão foram produzidas 2 lâminas

O *pellet* de células foi ressuspensionado em 250 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%-w/v em PBS) à 37°C nas linhagens de células B16-F10 e Melan-A. Na sequência, esta suspensão foi disposta em uma lâmina previamente revestida com agarose normal (1,5%-w/v em PBS) e recoberta por lamínula. Após breve solidificação da agarose à 4°C, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram incubadas em solução de lise (2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de tampão Tris-HCL, pH 10, com 1% Triton X-100 e 10% DMSO) por 2 horas. Após a lise, as lâminas da versão alcalina foram transferidas para a cuba de eletroforese contendo tampão alcalino (EDTA 200 mM, NaOH a 10 M, pH≥13) por 25 minutos e, em seguida, submetidas à eletroforese por mais 25 minutos (1 V/cm, 300 mA). Já para as lâminas da versão oxidativa uma etapa anterior a corrida de eletroforese foi realizada pela incubação das mesmas com a enzima hOGG1 (0,08 U em tampão HEPES 40 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl mol.L<sup>-1</sup>, EDTA 0,5 mmol.L<sup>-1</sup>, BSA 0,2 mg/ml, pH 8) por 30 minutos a 37°C.

Decorrido o tempo da corrida de eletroforese, todas as lâminas foram neutralizadas em tampão Tris-HCl a 4,85% (pH 7,5), fixadas em etanol absoluto por 5 minutos e guardadas à 4°C, até a realização das análises.

Células B16-F10 e Melan-A apenas cultivadas em seus respectivos meio de cultivo foram utilizadas como controle negativo. Como controles positivos das versões alcalina e oxidativa foram utilizados, respectivamente, MMS a 30 µg/mL (3 h de exposição das células em cultura) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,1 M (5 min de exposição em lâmina após incubação em tampão de lise). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

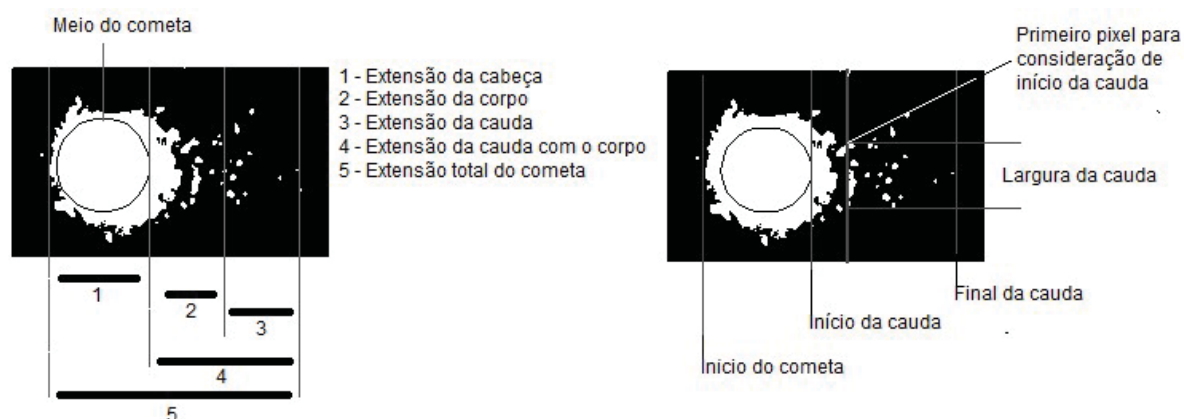
Em todos os Ensaios Cometa realizados foram feitos os controles para validação da técnica, sendo o tratamento com MMS como controle positivo de formação de quebras nas fitas do DNA (Cometa Clássico) e o tratamento com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como controle positivo da oxidação de bases para avaliação do funcionamento da enzima de reparo hOGG1 (Cometa Oxidativo).

O MMS é um agente alquilante capaz de provocar quebras no DNA, pois possui a capacidade de modificar tanto a guanina para 7-metilguanina quanto a adenina para 3-metiladenina, isto causa um desapareamento e bloqueio da replicação, induzindo assim as quebras nas fitas do DNA (BERANEK, 1990). Já o peróxido de hidrogênio possui a capacidade de danificar o DNA através da oxidação das bases (BIRBEN *et al.*, 2012).

As lâminas foram coradas com solução de brometo de etídio (20 µg/mL, Sigma-Aldrich) e examinadas em microscópio motorizado de epifluorescência (Axio Imager Z2, Carl Zeiss, Jena, DE), equipado com a digitalização automatizada Vslide (Metasystems, Altlussheim, DE). As lesões no DNA foram quantificadas quanto ao parâmetro intensidade de DNA na cauda (% Tail DNA) (KUMARAVEL *et al.*, 2009), utilizando o software de análise de imagem MetaSystems Images. Cem nucleóides selecionados ao acaso foram quantificados por tratamento. A “% DNA in tail” foi calculada a partir da fórmula abaixo, onde seus dados computadorizados foram obtidos conforme Figura 6.

$$\frac{\text{Tail Int. (Intensidade de cauda)}}{\text{Tot. Int. (Intensidade Total)}}$$

**FIGURA 6 - DESCRIÇÃO VISUAL DAS FORMULAS UTILIZADAS PARA CÁLCULOS DOS PARÂMETROS FORNECIDOS PELO SCANNER DE LÂMINAS UTILIZADO NO ENSAIO COMETA.**



FONTE: O autor (2016).

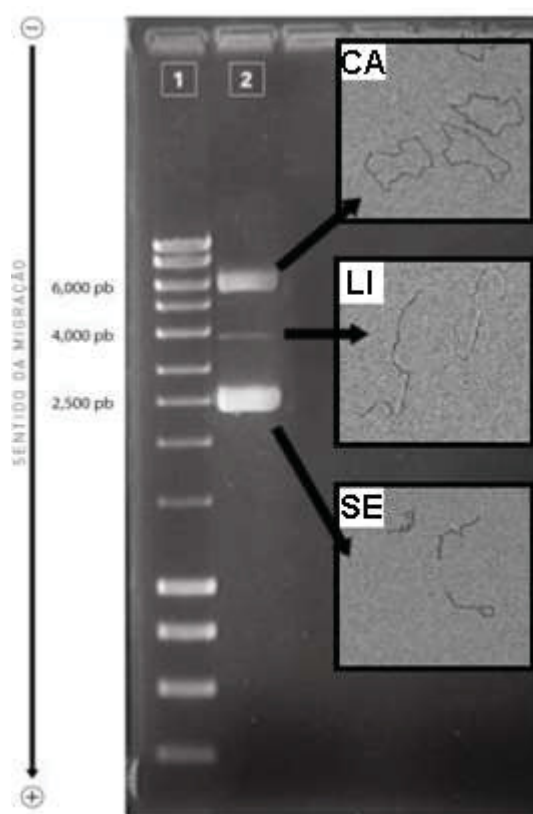
NOTA: Na imagem à esquerda descrição visual das células analisadas, na imagem à direita locais de início e fim utilizados para cálculos dos parâmetros.

## 4.8 ENSAIO PLASMIDIAL

### 4.8.1 Ensaio de quebras das fitas do DNA.

Utilizamos um ensaio *in vitro* para verificação dos danos nas fitas do DNA. O ensaio baseia-se no fato do DNA se apresentar em três possíveis formas em uma corrida de eletroforese. Ao se apresentarem intactos, os plasmídeos encontram-se em sua forma superenovelada. Havendo quebra em apenas uma das fitas, as mesmas passam por um relaxamento passando o plasmídeo para a forma circular aberta. Caso haja quebra em ambas as fitas, obtemos a forma linear. Todas estas formas do DNA migram em gel de forma diferente, separando-se entre si e dando origem a bandas em locais diferentes conforme Figura 7 a seguir:

**FIGURA 7 - FORMAS TOPOLÓGICAS DE UM PLASMÍDEO E DIFERENÇAS DE CORRIDA QUANDO SUBMETIDOS A ELETROFORESE**



FONTE: Adaptado de MOLLOY *et al.*, 2008

NOTA: (1) Marcador de peso molecular. (2) Várias isoformas de um plasmídeo com imagens de microscopia eletrônica correspondente: CA - Circular Aberta; LI- linear; SE – Superenovelado.

No ensaio, o plasmídeo pUC18  $7,5 \text{ ng}/\mu\text{L}^{-1}$  foi incubado na presença de Rosa Bengala  $10 \mu\text{M}$  e irradiado por 90 minutos em câmara de LED. Após, adicionou-se o composto DHICA  $2 \text{ mM}$  sendo posteriormente incubados por 5 minutos em *Shaker* a  $37^\circ\text{C}$  250 rpm. Decorrido o tempo de incubação adicionou-se a enzima reparadora hOGG1  $0,8 \text{ U}$  sendo novamente incubado em *Shaker* a  $37^\circ\text{C}$  250 rpm. Ao término da incubação foram adicionados à solução plasmidial FSUDS (azul de bromofenol  $0,25\%$  (p/v), xileno cianol  $0,25\%$  (p/v), Ficoll  $25\%$  (p/v), SDS  $0,5\%$  (p/v), Tris-HCl  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  pH 8,0 e EDTA  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  pH 8,0) e a reação transferida para gel de agarose onde foi submetido a corrida eletroforética por 2 horas e 30 minutos a  $45 \text{ V}$  em miliamperagem auto ajustada em aproximadamente  $25 \text{ mA}$  em agarose  $1\%$  utilizando tampão TBE (Tris-borato  $89 \text{ mM}$ , EDTA  $2 \text{ mM}$ , pH 8). Para visualização das bandas de DNA, foi utilizado o intercalante de DNA brometo de etídeo ( $0,02 \mu\text{L}/\text{mL}$ ). As bandas foram analisadas por densitometria pelo programa ImageJ (Wayne Rasband – *National Intituto of Health* – USA). A porcentagem de quebra do DNA foi calculada pela quantidade relativa das formas Linear (L), circular aberta (CA) e superenovelada

(SE), utilizando a seguinte fórmula de correção uma vez que a fluorescência da forma superenovelada é menor comparando com as demais.

$$\% \text{ Quebras DNA} = \left( \frac{\text{Linear (LI)} + \text{Circular Aberta (CA)}}{1.4 \times \text{Supernovelada (SE)} + \text{Linear (LI)} + \text{Circular Aberta}} \right) \times 100$$

Para cada reação foi realizado o controle negativo com o veículo, sendo H<sub>2</sub>O para as reações que envolvam Rosa Bengala, DMSO para o DHICA e tampão comercial da enzima para reações referentes a hOGG1. Também foi determinado um ensaio na ausência de irradiação, onde após a adição do Rosa Bengala, o plasmídeo foi imediatamente incubado com DHICA dando continuidade ao processo descrito acima.

#### 4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises estatísticas dos experimentos realizados foram analisadas pelo teste ANOVA (*Analysis of Variance*), esta técnica permite a comparação considerando grupos, tempos ou combinações, inclusive com outras variáveis (CHAMBERS; FREENY; HEIBERGER, 1992). Ela é útil especialmente ao se comparar ao menos 3 conjuntos. O valor p é utilizado como referência para decisão, valores p < 0,05 indicam evidência de diferença significativa, ainda assim este teste por si só não revela especificamente onde se encontram as diferenças para tal faz-se necessário uma análise suplementar, neste caso um *post-hoc*.

O teste de *Dunnett* (1955) foi empregado nos casos em que se comparam diversos grupos com um grupo controle (BRETZ; HOTHORN; WESTFALL, 2010). Nos casos em que se comparam todos os grupos entre si, o teste de *Tukey* foi o *post-hoc* escolhido (YANDELL, 1997).

Os testes *Dunnett* e *Tukey* apresentam a evidência sobre a comparação de cada dois grupos, dentre os grupos existentes, a referência adotada para que se diga que existe evidência estatística de diferença é do valor p < 0,05.

Foram considerados significativos os resultados com \*p < 0,05. \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 \*\*\*p<0,0001. O software utilizado para as comparações estatísticas foi o “R” versão R core Team 2014 de código livre, *The R Foundation for Statistical Computing* iniciativa de *The R journal*.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 VIABILIDADE CELULAR

#### 5.1.1 Viabilidade de células B16-F10 e Melan-A na ausência e presença de DHICA, fotossensibilizador e irradiação pelo método de MTT

Os resultados demonstram que as células não irradiadas de ambas as linhagens (Figuras 08 e 09) não possuem diferenças estatísticas entre os grupos analisados, confirmando que o RBAC ou o DHICA nas concentrações utilizadas não possuem capacidade de reduzir a viabilidade celular dessas linhagens. Estes resultados são similares aos encontrados no trabalho de Suzukawa (2012) onde células das linhagens WM9, WM35 e 1205Lu não apresentaram redução na viabilidade celular quando submetidas a tratamento somente com Rosa Bengala Acetato em concentrações de até 50  $\mu\text{M}$  na ausência de irradiação (SUZUKAWA, 2012). Genez, (2015) também demonstrou que células das linhagens B16-F10 e Melan-A tratadas com RBAC não apresentam redução (concentração testada 0,5; 2,0; 5,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) quando não irradiadas (GENEZ, 2015).

Nos estudos realizados por Kovacs *et al.*, (2012), os ensaios de viabilidade (MTT) em células de queratinócitos humanos (NHKs) não apresentaram decréscimo na viabilidade celular com tratamento com DHICA nas concentrações de 5, 25 e 50  $\mu\text{M}$  pelo período de 24 horas. (KOVACS *et al.*, 2012). Em nossos ensaios, até a concentração de 150  $\mu\text{M}$  pelo período 18 horas, os resultados foram similares, não diferindo estatisticamente em relação ao controle.

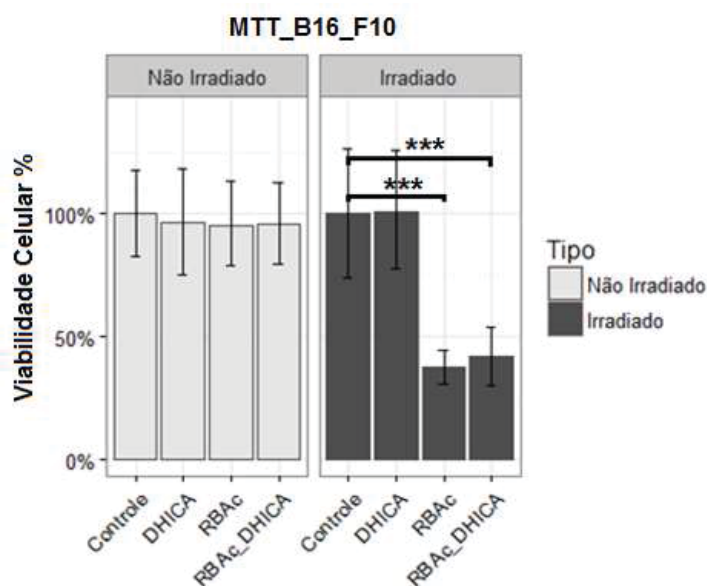
Testes preliminares nas concentrações de 200  $\mu\text{M}$  até 1000  $\mu\text{M}$  por 24h mostraram aumento na pigmentação das células, provavelmente por estarmos fornecendo um precursor da melanina, produzindo interferência nos testes que utilizavam espectrofotometria (MTT e CV) (dados não mostrados). Diante disso, justifica-se a escolha da concentração utilizada de 150  $\mu\text{M}$ .

Já nos experimentos onde as células foram irradiadas, os resultados demonstram que na ausência de RBAC, após 18 horas de tratamento com DHICA, não houve diminuição na viabilidade celular de ambas as linhagens.

Células B16-F10 (Figura 08) submetidas à RBAc-PDT demonstraram uma redução de aproximadamente 55% na viabilidade quando comparadas com o controle (células irradiadas sem RBAc). Resultados similares foram observados na linhagem Melan-A (Figura 09) os quais demonstraram uma diminuição na viabilidade de aproximadamente 51%. Estes resultados apresentados mostram uma menor viabilidade após ao tratamento quando comparados com resultados do trabalho de Genez (2015) onde se obteve redução de aproximadamente 40% (concentração de  $5,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) na linhagem B16-F10 e aproximadamente 20% com a mesma concentração na linhagem Melan-A (GENEZ, 2015). A razão para essas diferenças não puderam ser esclarecidas.

A presença de DHICA após RBAc-PDT não provocou uma mudança estatística quando comparada com células que receberam somente RBAc-PDT em ambas as linhagens.

**FIGURA 8 - VIABILIDADE DE CÉLULAS B16-F10 PELO MÉTODO DE MTT**

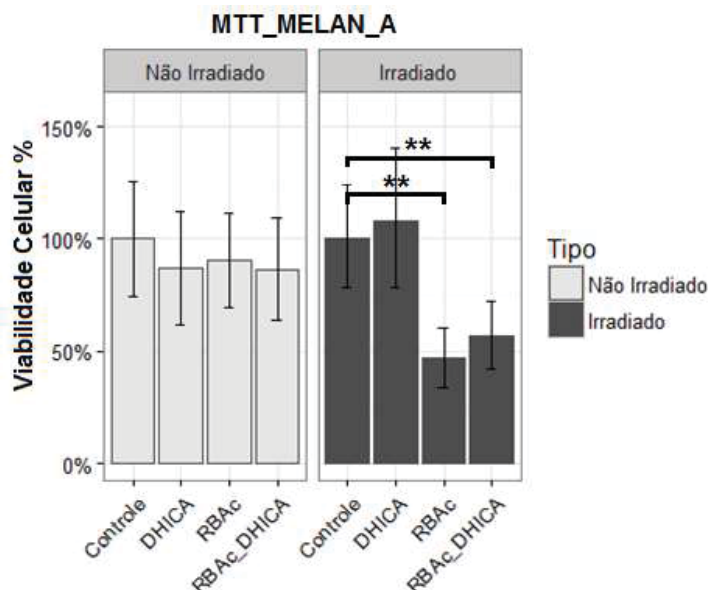


FONTE: O autor (2016).

NOTA: Efeito do DHICA sobre a viabilidade de células fotossensibilizadas. Células foram internalizadas com  $5\mu\text{g/ml}^{-1}$  de Rosa Bengala Acetato por 2 horas e irradiadas ( $1,5 \text{ J/cm}^2$ ) em câmara de LED por 15 minutos. Após, realizado tratamento com  $150\mu\text{M}$  de DHICA por 18 horas. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em quadruplicata. Utilizou-se para análise estatística o teste ANOVA seguido de teste de *Dunnett* como *post-hoc*. (\*\*\*) $p < 0,001$



**FIGURA 9 - VIABILIDADE DE CÉLULAS MELAN-A PELO MÉTODO DE MTT**



FONTE: O AUTOR (2016).

NOTA: Efeito do DHICA sobre a viabilidade de células fotossensibilizadas. Células foram internalizadas com  $5\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$  de Rosa Bengala Acetato por 2 horas e irradiadas ( $1,5\text{ J}/\text{cm}^2$ ) em câmara de LED por 15 minutos. Após, realizado tratamento com  $150\mu\text{M}$  de DHICA por 18 horas. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em quadruplicata. Utilizou-se para análise estatística o teste ANOVA seguido de teste de *Dunnett* como *post-hoc*. (\*\* $p < 0,01$ )

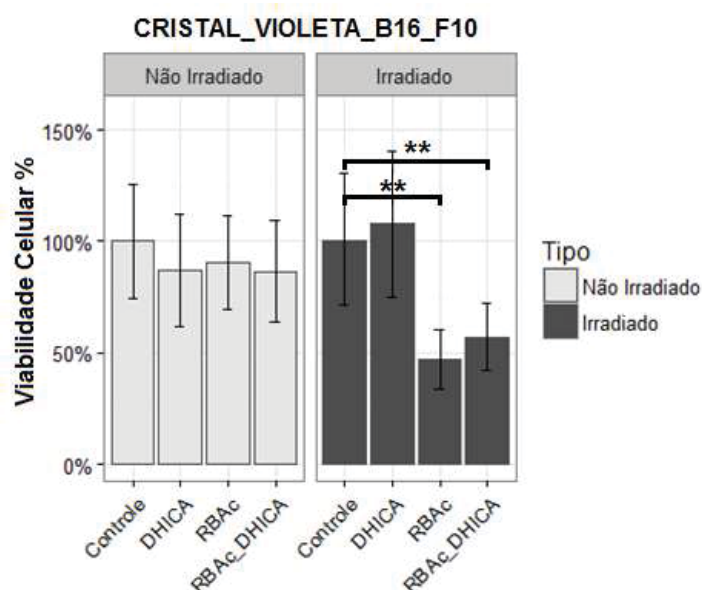
#### 5.1.2 Viabilidade de células B16-F10 e Melan-A na ausência e presença de DHICA, fotossensibilizador e irradiação pela método de Cristal Violeta

Os resultados demonstram que em ambos os experimentos as células não irradiadas (Figuras 10 e 11) de ambas as linhagens não possuem diferenças estatísticas entre os grupos analisados, confirmando que o composto fotossensibilizador na concentração utilizada não possui capacidade de contribuir para a diminuição na viabilidade celular. Estes resultados diferem dos encontrados por Genez, (2015) onde para a linhagem B16-F10 na ausência de irradiação na concentração de  $2,0\text{ }\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  apresentou uma redução de 28% e para a linhagem Melan-A obtiveram reduções de 18; 10 e 12% nas concentrações de 0,5; 2,0 e  $5,0\text{ }\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  respectivamente (GENEZ, 2015). Estes perfis diferentes entre os trabalhos podem ter origem nas concentrações celulares as quais as células foram plaqueadas uma vez que utilizamos  $1 \times 10^5$  por poço e Genez (2015) usou  $2 \times 10^4$ , porém estudos posteriores devem ser realizados para verificação de outras hipóteses como qualidade da linhagem celular e padronização do ensaio.

Assim como no ensaio MTT, o composto DHICA (150  $\mu$ M) não contribuiu estatisticamente para a diminuição na viabilidade celular em ambas as linhagens.

Nos experimentos onde as células foram irradiadas, os resultados demonstram que na ausência de RBAc, após 18 horas de tratamento com DHICA não houve diminuição na viabilidade celular de ambas as linhagens. Células B16-F10 (Figura 10) submetidas a RBAc-PDT demonstraram uma redução de aproximadamente 51% na viabilidade quando comparadas com o controle (células irradiadas sem RBAc). Resultados similares foram observados na linhagem Melan-A (Figura 11) os quais demonstraram uma diminuição na viabilidade de aproximadamente 50%. Estes resultados assemelham-se no quesito presença de queda na viabilidade celular quando comparados ao trabalhos de Genez, (2015) que apresentou reduções de até 27% para a linhagem B16-F10 e 36% para a linhagem Melan-A nas concentrações testadas (GENEZ, 2015). A presença de DHICA após RBAc-PDT não provocou uma mudança estatística quando comparada com células que receberam somente RBAc-PDT em ambas as linhagens.

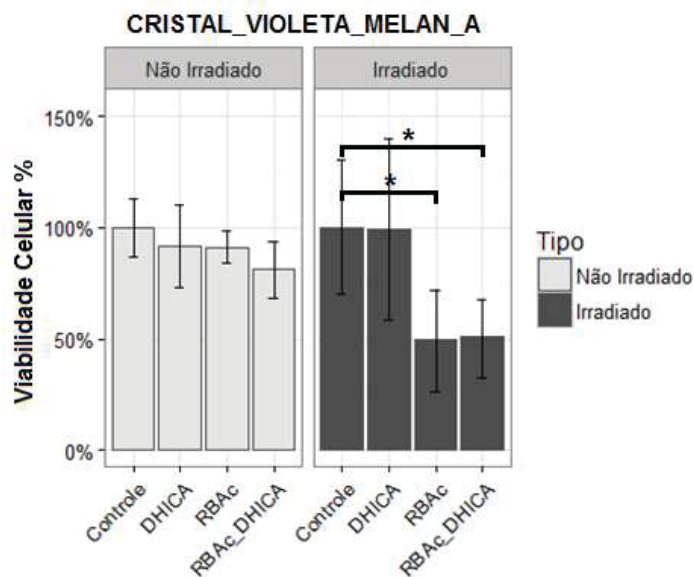
**FIGURA 10 - VIABILIDADE DE CÉLULAS B16-F10 PELO MÉTODO DE CRISTAL VIOLETA**



FONTE: O AUTOR (2016).

NOTA: Efeito do DHICA sobre a viabilidade de células fotossensibilizadas. Células foram internalizadas com 5 $\mu$ g/ml<sup>-1</sup> de Rosa Bengala Acetato por 2 horas e irradiadas (1,5 J/cm<sup>2</sup>) em câmara de LED por 15 minutos. Após, realizado tratamento com 150 $\mu$ M de DHICA por 18 horas. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em quadruplicata. Utilizou-se para análise estatística o teste ANOVA seguido de teste de *Dunnett* como *post-hoc*. (\*\*p<0,01)

**FIGURA 11 - VIABILIDADE DE CÉLULAS MELAN-A PELO MÉTODO DE CRISTAL VIOLETA**



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Efeito do DHICA sobre a viabilidade de células fotossensibilizadas. Células foram internalizadas com  $5\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$  de Rosa Bengala Acetato por 2 horas e irradiadas ( $1,5 \text{ J}/\text{cm}^2$ ) em câmara de LED por 15 minutos. Após, realizado tratamento com  $150\mu\text{M}$  de DHICA por 18 horas. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em quadruplicata. Utilizou-se para análise estatística o teste ANOVA seguido de teste de *Dunnett* como *post-hoc*. (\* $p < 0,05$ )

Os resultados apresentados, tanto para os grupos não irradiados quanto irradiados eram esperados uma vez que a concentração de DHICA escolhida havia sido previamente estudada, e como descrito não sendo capaz de reduzir a viabilidade celular em ambas as linhagens. Quanto a utilização do corante fotossensibilizador Rosa Bengala Acetato (RBAC) estudos prévios mostraram que o mesmo por se tratar de uma droga não tóxica para a célula administrado de forma local ou sistêmica possui a capacidade de geração de Oxigênio Singlete ( $^1\text{O}_2$ ) (LUTTRUL, 1988), sendo assim, era certo que na concentração escolhida houvesse a geração de danos oxidativos que poderiam levar a morte celular por danos diretos à célula, danos a vascularização diminuindo a viabilidade celular e danos ao DNA. Pode-se verificar também que não houve mudança no perfil dos grupos quando utilizamos concomitantemente os compostos RBAC e DHICA, mostrando que a nível celular não há nenhuma interação entre os compostos que levariam a um aumento ou decréscimo nos gráficos de viabilidade. Apesar de mínimas, podemos verificar que há diferenças (não estatísticas) na queda de viabilidade entre as linhagens B16-F10 e Melan-A, sendo mais acentuada na primeira, isto também era esperado uma vez que conforme Fang *et al.*, (2009)

células tumorais são mais susceptíveis a danos causados por ROS (FANG; SEKI; MAEDA, 2009).

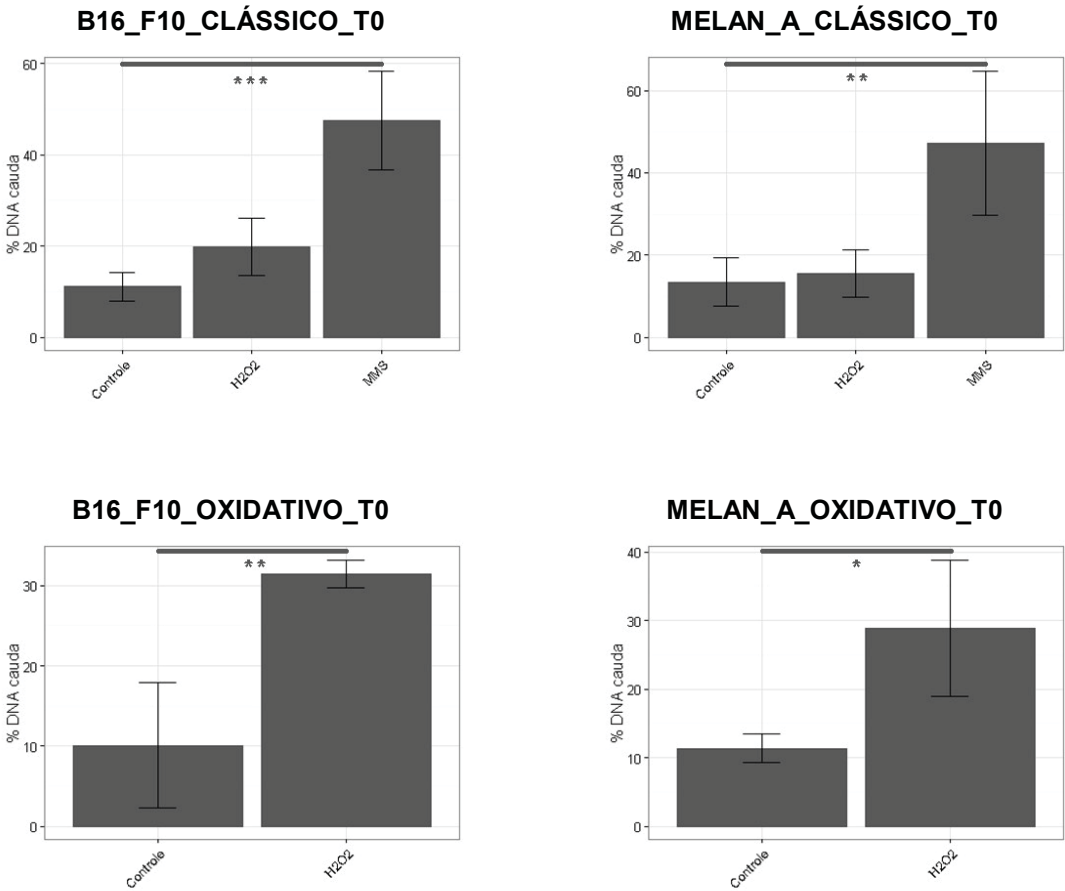
## 5.2 ENSAIO COMETA

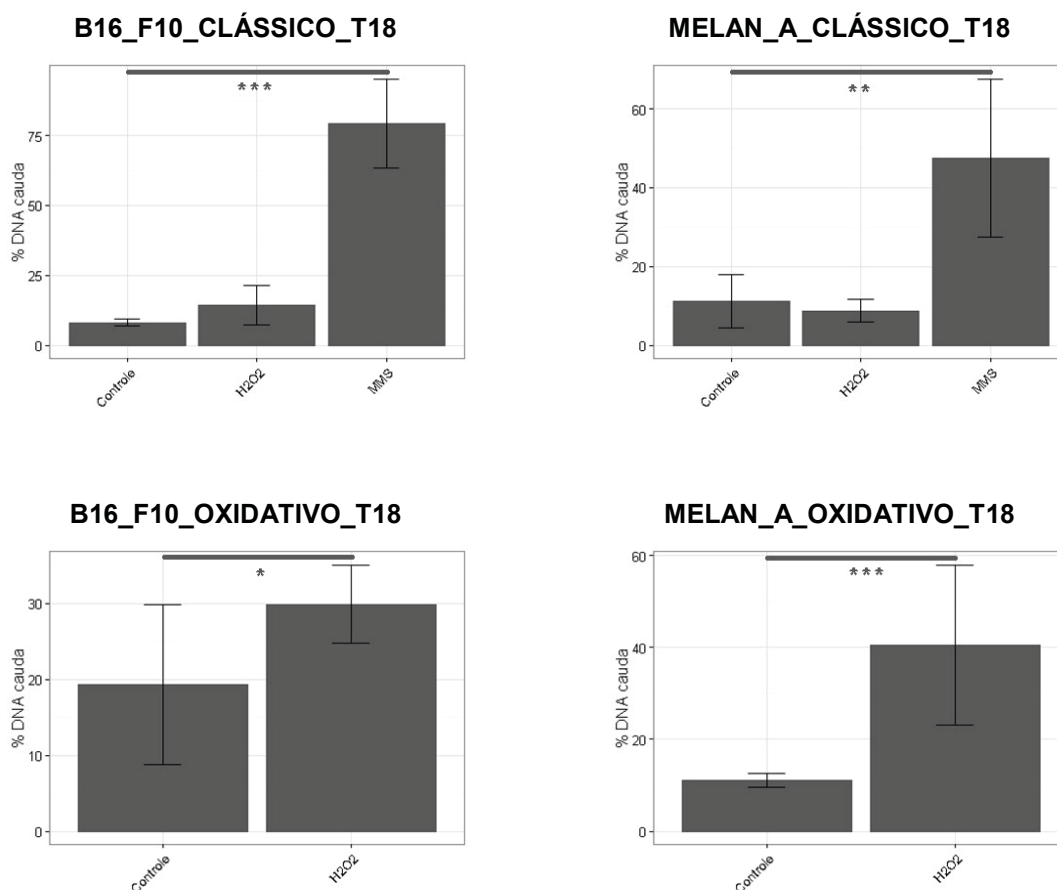
### 5.2.1 Avaliação dos danos e reparo do DNA pelo ensaio Cometa

Os níveis de danos basais das linhagens B16-F10 e Melan-A foram avaliados pelo Ensaio Cometa. O Ensaio Cometa permite a avaliação ao mesmo tempo de quebras no DNA, assim como a presença ou não de danos oxidativos nas bases por meio do aumento de quebras pela ação de enzimas de reparo, como a hOGG1 utilizada neste trabalho, que reconhece preferencialmente a 8-oxodGuo.

A figura 12 mostra os resultados dos controles positivos tanto para o Ensaio Cometa clássico como para o oxidativo.

**FIGURA 12 - CONTROLES UTILIZADOS NO ENSAIO COMETA CLASSICO E OXIDATIVO**





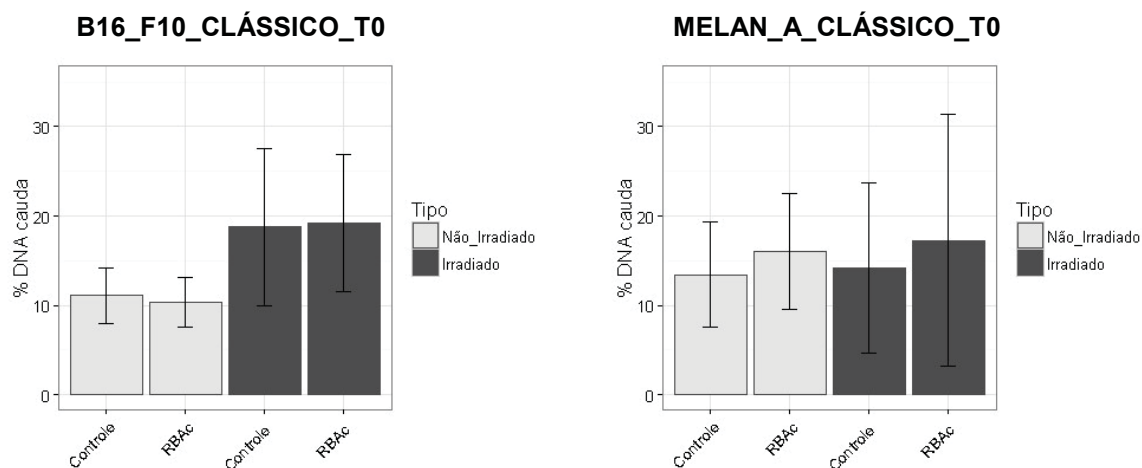
FONTE: O AUTOR (2016).

NOTA: Para o Ensaio Cometa Clássico (sem adição da enzima hOGG1), foi utilizado como controle da técnica a exposição em cultivo celular ao MMS (30 µg/mL) por 2 horas antes da produção das lâminas. Para o Ensaio Cometa Oxidativo (com adição da enzima hOGG1), foi utilizado como controle da técnica a exposição da lâmina com os nucleóides ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1M) por 5 minutos. Utilizou-se para análise estatística o teste ANOVA seguido do teste de *Dunnett* como *post-hoc*. (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001)

Para avaliação da capacidade de reparo das células diante incubação com o composto DHICA realizamos dois experimentos, sendo um imediatamente após irradiação (sem a presença de DHICA), e outro 18 horas de incubação com a presença do DHICA na concentração de 150 µM.

Conforme pode ser observado na Figura 13, tanto para as linhagens B16-F10 e Melan-A, o cometa aqui definido como Clássico (sem a presença de hOGG1) não mostrou diferença entre os grupos irradiados ou não. Este resultado era esperado, visto que possíveis lesões oxidativas induzidas pelo <sup>1</sup>O<sub>2</sub> não poderiam ser evidenciadas sem a presença de uma enzima de reparo.

**FIGURA 13 - ENSAIO COMETA CLÁSSICO DE CÉLULAS B16-F10 E MELAN-A TEMPO 0**

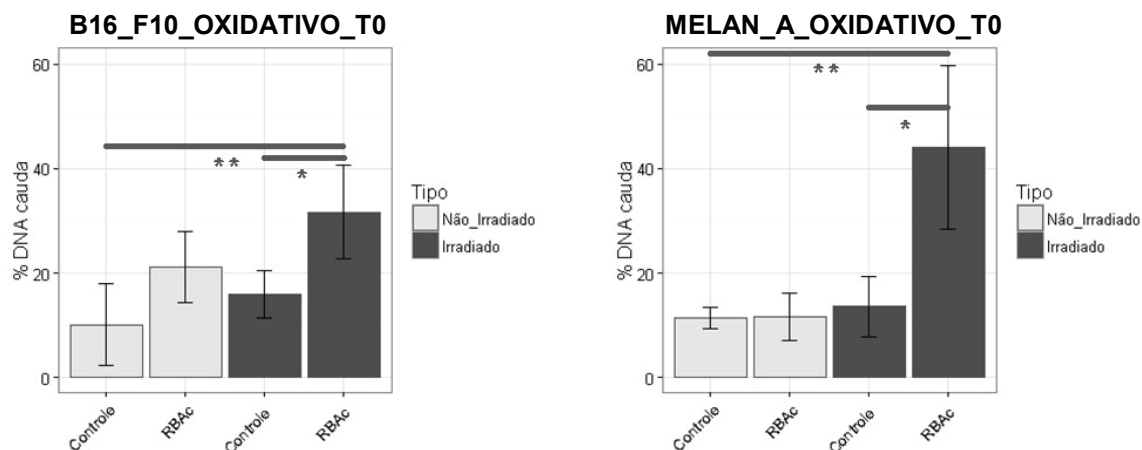


FONTE: O AUTOR (2016).

NOTA: Os níveis de danos ao DNA foram analisados pelo ensaio cometa, conforme descrito nos itens 4.7 e 4.8. O resultados estão expressos a partir do valor de “% DNA na cauda”. Neste gráfico estão mostrados os níveis de danos imediatamente após irradiação ou não. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. Utilizou-se para análise estatística o teste ANOVA seguido de teste de *Dunnett* como *post-hoc*.

Na Figura 14 pode ser observada a presença mais elevada de danos em grupos em que a formação de lesões oxidativas é provável, como o grupo com Rosa Bengala Acetato irradiado (RBAC-PDT). A formação de quebras nas fitas se deve à presença da enzima de reparo que cliva o DNA em locais com lesões, especificamente lesões da 8-oxodGuo. Os demais grupos permaneceram sem significância estatística, visto que os tratamentos não causaram nenhum tipo de dano detectável nessas condições. Este experimento foi realizado imediatamente após irradiação ou não. Resultados semelhantes foram visualizados no trabalho de Collins *et al.*, (2001), no qual o grupo com o corante fotossensibilizador apresentou mais incidência de danos quando irradiado e o grupo apenas irradiado não apresentou danos em células HeLa (COLLINS *et al.*, 2001). Observa-se também maior suscetibilidade a danos da linhagem Melan-A em relação a linhagem B16-F10.

**FIGURA 14 - ENSAIO COMETA OXIDATIVO DE CÉLULAS B16-F10 E MELAN-A TEMPO 0**

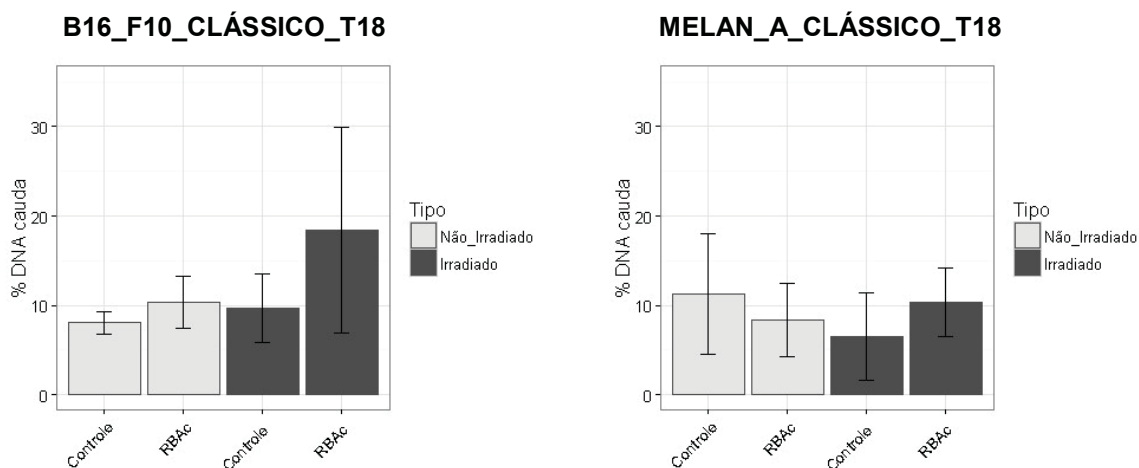


FONTE: O AUTOR (2016).

NOTA: Os níveis de danos ao DNA foram analisados pelo ensaio cometa, conforme descrito nos itens 4.7 e 4.8. O resultados estão expressos a partir do valor de “% DNA na cauda”. Neste gráfico estão mostrados os níveis de danos imediatamente após irradiação ou não com a presença da enzima de reparo hOGG1. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. Utilizou-se para análise estatística o teste ANOVA seguido de teste de *Dunnett* como *post-hoc*. (\* $p < 0,05$ . \*\* $p < 0,01$ )

Na Figura 15 estão demonstrados os resultados referentes ao ensaio cometa clássico após 18 horas de incubação. Como observado na Figura 13, não há diferença entre os grupos irradiados ou não. Este resultado era esperado, visto que possíveis lesões oxidativas induzidas pelo  $^1\text{O}_2$  não poderiam ser evidenciadas sem a presença de uma enzima de reparo. Nota-se pelos dados apresentados que a linhagem Melan-A é mais susceptível a danos quando comparado a linhagem B16-F10.

**FIGURA 15 - ENSAIO COMETA CLÁSSICO DE CÉLULAS B16-F10 E MELAN-A TEMPO 18**



FONTE: O AUTOR (2016).

NOTA: Os níveis de danos ao DNA foram analisados pelo ensaio cometa, conforme descrito nos itens 4.7 e 4.8. O resultados estão expressos a partir do valor de “% DNA na cauda”. Neste gráfico estão mostrados os níveis de danos após 18 horas da irradiação ou não. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. Utilizou-se para análise estatística o teste ANOVA seguido de teste de *Dunnett* como *post-hoc*.

Os gráficos a seguir na Figura 16 referem-se ao cometa oxidativo após 18 horas incubação agora com a presença do composto polimérico precursor da melanina o DHICA. Conforme verificado no gráfico, não há diferenças estatísticas entre os grupos, evidenciando que houve reparo nas lesões ocasionadas após período de incubação de 18 horas. O resultado também evidencia que a presença do DHICA não interferiu na capacidade de reparo das células.

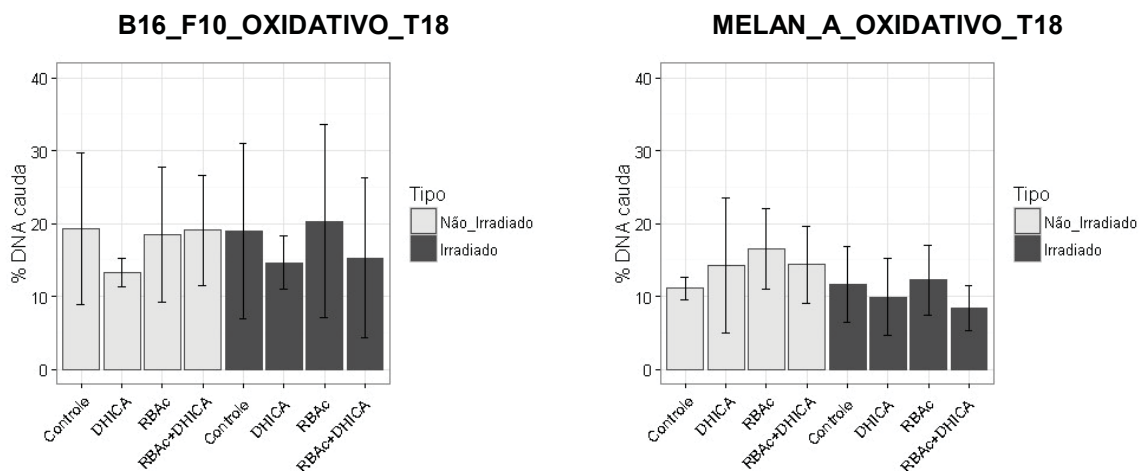
A princípio era esperado que as linhagens utilizadas apresentassem um maior índice de danos quando incubadas com DHICA, pois nos resultados de ensaios plasmidiais o composto tem a capacidade de levar a quebra (PELLOSI *et al.*, 2014), entretanto não houve diferenças na sua adição. Deve-se levar em consideração que para os ensaios plasmidiais o DNA foi incubado com concentração de DHICA quase 14 vezes superior aos ensaios com células. Levanta-se também a questão se o DHICA ou uma pequena porção da concentração utilizada possui a capacidade de chegar até o núcleo atuando diretamente sobre o DNA. Sabe-se que ele possui a capacidade de entrar na célula, uma vez que promove a pigmentação como já mencionado, porém a investigação sobre seu acesso ao núcleo deve ser mais aprofundada.

O aumento dos níveis de danos causados pelo  $^1\text{O}_2$  não levou diretamente a quebra do DNA, mais sim a formação de 8-oxodGuo (danos oxidativos produzidos por RBAC+PDT) evidenciado posteriormente pela adição da enzima hOGG1, este



aumento foi de aproximadamente 4x para a linhagem B16-F10 e 5x para a Melan-A resultados semelhantes aos encontrados por Suzukawa, (2012) onde obteve-se aumento de 5,5x para linhagem WM9, 5,6x para a linhagem WM35 e 3,7x para a 1205Lu (SUZUKAWA, 2012).

**FIGURA 16 - ENSAIO COMETA OXIDATIVO DE CÉLULAS B16-F10 E MELAN-A TEMPO 18**



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Os níveis de danos ao DNA foram analisados pelo ensaio cometa, conforme descrito nos itens 4.7 e 4.8. O resultados estão expressos a partir do valor de “% DNA na cauda”. Neste gráfico estão mostrados os níveis de danos após 18 horas da irradiação ou não com a presença da enzima de reparo hOGG1. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. Utilizou-se para análise estatística o teste ANOVA seguido de teste de Tukey como *post-hoc*.

O ensaio cometa foi escolhido para avaliação da capacidade de reparo das linhagens celulares e verificar a interferência do composto DHICA, pois se trata de um método muito sensível para detecção de danos ao DNA (COLLINS *et al.*, 2001).

Quanto à utilização de enzimas glicosilases purificadas, as mesmas são úteis, pois convertem danos em quebras, promovendo a visualização via ensaio cometa (COLLINS *et al.*, 1996). A escolha da hOGG1 baseia-se na sua especificidade em relação ao outras comumente utilizadas para ensaios oxidativos, tais como Fpg e ENDOIII (SMITH; O'DONOVAN; MARTIN, 2006)

Comparando os resultados das figuras 14 e 16, podemos observar que as lesões oxidativas promovidas pelo  $^1\text{O}_2$  via fotossensibilização foram reparadas após 18 horas de incubação em ambas as linhagens. Além disso, o tratamento com DHICA evidenciou que a sua presença não afeta o reconhecimento das lesões pela enzima

reparadora nas células, pois não se observa a permanência dos danos após 18 h nos grupos com DHICA para ambas as linhagens.

Pellosi *et al.* (2014) mostrou que o DHICA o reconhecimento das lesões pela enzima de reparo bacteriana Fpg. Entretanto, os resultados mostrados acima não confirmam a previsão de um possível persistência dos danos na presença de DHICA.

### 5.3 ENSAIO COM DNA PLASMIDIAL

#### 5.3.1 Incubação do DNA com DHICA e $^1\text{O}_2$

Realizou-se a incubação do DNA com DHICA na presença e ausência de  $^1\text{O}_2$ , utilizando como gerador desta espécie reativa de oxigênio o fotossensibilizador Rosa Bengala (RB) 20  $\mu\text{M}$  seguido de irradiação em câmara de LED por 90 minutos. Utilizou-se também a incubação com a enzima de reparo hOGG1 (isoforma humana da enzima OGG1) com a finalidade de se evidenciar o aparecimento ou não de lesões do tipo oxidativa no DNA.

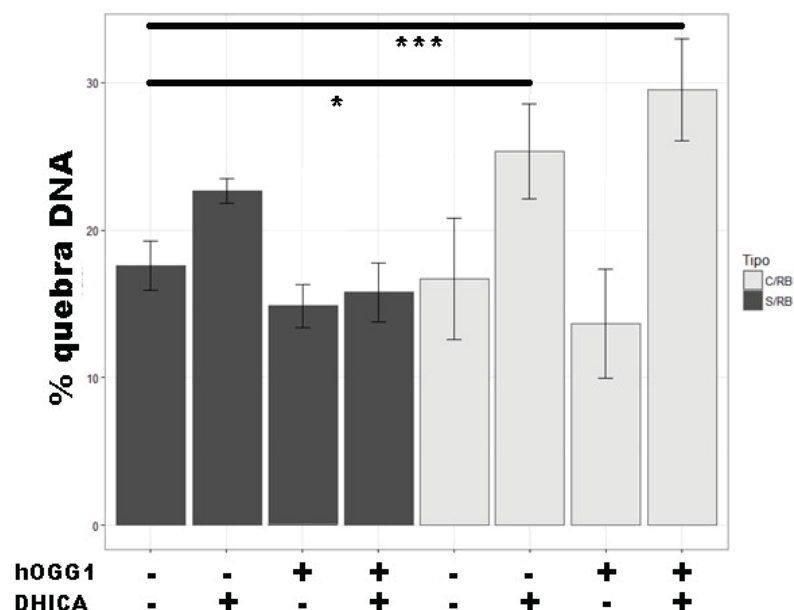
Neste experimento, o composto DHICA (2 mM) sozinho não causou aumento significativo na quebra do DNA, diferentemente do aumento de cerca de 4 vezes observado no trabalho realizado por PELLOSI (2013), isto se deve provavelmente aos tempos de incubações diferentes, onde utilizamos 5 minutos à 37°C em Shaker a 250 rpm protegido do escuro, frente a uma incubação de 2h30min com as mesmas condições (PELLOSI, 2013; PELLOSI *et al.*, 2014)

Na Figura 17 podemos observar que o fotossensibilizador sozinho não foi suficiente para aumentar a porcentagem de quebra de DNA mesmo após a adição das enzimas de reparo. Isto se deve ao fato dos resultados demonstrados se referirem ao experimento não irradiado, sendo assim, não havendo a produção de espécies reativas de oxigênio que poderiam causar lesões promovendo dano nas bases.

A partir dos resultados obtidos na Figura 17 (não irradiado), observamos que o composto DHICA (2 mM) quando em conjunto com o fotossensibilizador Rosa Bengala foi capaz de promover quebra no DNA plasmidial, aumentando em aproximadamente 44% comparado com o controle e a incubação posterior com a enzima de reparo hOGG1 não mostrou aumento do nível dos danos.

No caso dos grupos sem a adição do Rosa Bengala, todos se mantiveram parecidos com o controle mesmo com a adição do DHICA e da enzima de reparo.

**FIGURA 17 - INCUBAÇÃO DO DNA (PUC18) COM RB, DHICA E hOGG1 – NÃO IRRADIADO**



FONTE: O autor (2016).

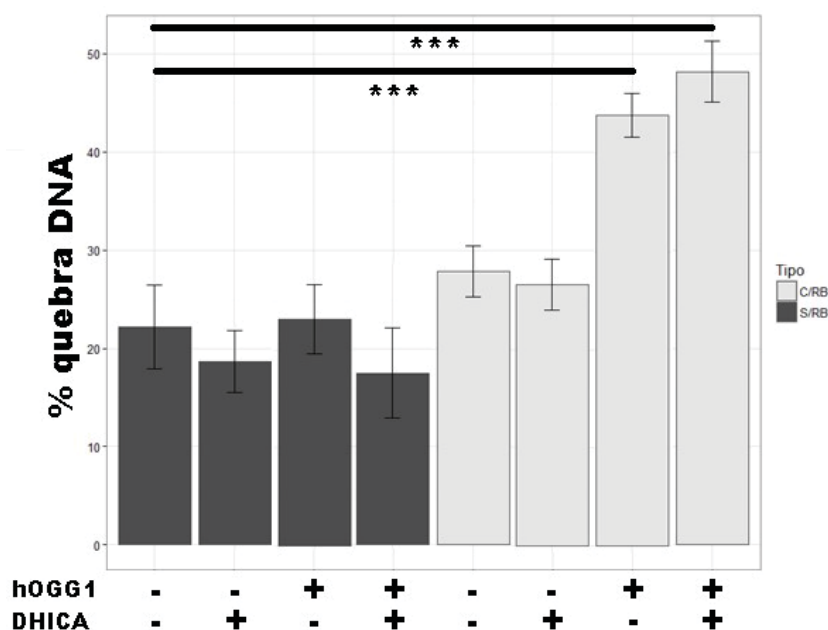
NOTA: O DNA (7,5 ng/μL) foi incubado com Rosa Bengala (20μM), protegido da luz por 90 minutos, após adicionou-se DHICA (2mM) e novamente incubado por 5 minutos a 37°C em Shaker 250 rpm. Decorrido o tempo, a solução DNA+RB+DHICA foi incubada com 0,8U de enzima de reparo hOGG1 por 30 minutos. O controle é referente ao DNA que não sofreu incubação com nenhuma das espécies. A porcentagem de quebra foi avaliada em eletroforese em gel de agarose (1%) e as bandas analisadas pelo programa ImageJ. Os resultados estão expressos como a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. Utilizou-se para análise estatística o teste ANOVA seguido de teste de *Dunnett* como *post-hoc*. (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )

Analizando os resultados obtidos na Figura 18 (Irradiado), observamos que a presença da fotossensibilizador quando irradiado produz danos oxidativos, mas não quebra. Isto se deve ao fato da porcentagem de quebra do DNA somente elevar-se quando há adição da enzima de reparo, promovendo um aumento de aproximadamente 50%.

Neste experimento o DHICA sozinho também não levou a um aumento na quebra do DNA e quando comparamos as colunas com a presença do fotossensibilizador face a sua presença conjunta com DHICA não obtivemos diferenças estatísticas, evidenciando que o DHICA não tem a capacidade de interferir na funcionalidade da enzima de reparo hOGG1.

Assim como no experimento não irradiado os grupos sem a adição do Rosa Bengala mantiveram-se parecidos com o controle mesmo com a adição do DHICA e da enzima de reparo.

**FIGURA 18 - INCUBAÇÃO DO DNA (PUC18) COM RB, DHICA E hOGG1 – IRRADIADO**



FONTE: O autor (2016).

NOTA: O DNA (7,5 ng/ $\mu$ L) foi incubado com Rosa Bengala (20 $\mu$ M) por 90 minutos sob irradiação em câmara de LED (1,5 J/cm<sup>2</sup>), após adicionou-se DHICA (2mM) e novamente incubado por 5 minutos a 37°C em *Shaker* 250 rpm, protegido da luz. Decorrido o tempo, a solução DNA+RB+DHICA foi incubada com 0,8U de enzima de reparo hOGG1 por 30 minutos. O controle é referente ao DNA que não sofreu incubação com nenhuma das espécies. A porcentagem de quebra foi avaliada em eletroforese em gel de agarose (1%) e as bandas analisadas pelo programa ImageJ. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. Utilizou-se para análise estatística o teste ANOVA seguido de teste de *Dunnnett* como *post-hoc*. (\*\*\*) $p < 0,001$ )

Em ambos os experimentos, os resultados mostraram que a presença do DHICA não impede a clivagem do DNA oxidado pela enzima hOGG1. No seu trabalho, PELLOSI (2013) sugere que o precursor da melanina ou interfere diretamente na atividade da enzima (no caso Enzima Fpg) ou o DHICA poderia ter preferência por interagir com o DNA lesionado realizando uma possível interação, diminuindo o reconhecimento da enzima Fpg aos sítios lesionados do DNA (PELLOSI, 2013; PELLOSI *et al.*, 2014).

David *et al.* (2007) afirmaram que o entendimento dos mecanismos pelos quais as enzimas glicosilases localizam alterações no DNA e posteriormente realização o Reparo por Excisão de Bases (BER) são questões fundamentais para as funções na prevenção das mutações de doenças, uma vez que estas enzimas localizam alterações nas bases e catalisam a quebra das pontes *N*-glicosídicas com alta

eficiência e especificidade (DAVID; O'SHEA; KUNDU, 2012). No trabalho de McKibbin *et al.* (2012), estudos foram realizados entre as duas enzimas citadas (hOGG1 e Fpg) demonstrando diferenças nos seus mecanismos de reconhecimento de dano e remoção (MCKIBBIN *et al.*, 2012).

Quanto ao quesito estrutural, o reconhecimento pela enzima Fpg acomoda a 8-oxoG orientada a conformação *syn*, com pontes de hidrogênio no NH7 e grupos amino/imina ao longo da borda do pareamento Watson-Crick. Ainda nesse contexto, a enzima Fpg possui a capacidade de clivar uma vasta gama de guaninas e timinas oxidadas. Por outro lado, a enzima hOGG1 acomoda a 8-oxoG orientada a conformação *anti* com pontes de hidrogênio da enzima usando resíduos de aminoácidos bem como moléculas de água firmemente ligadas aos grupos amino/imina e ao NH7 da 8-oxoG (BRUNER; NORMAN; VERDINE, 2000), estas diferenças podem estar relacionadas ao reconhecimento diferenciado das lesões, porém ainda não comprovados.

Para auxiliar na elucidação destas diferenças de reconhecimento pelas enzimas Fpg e hOGG1, McKibbin *et al.* (2012) realizaram ensaios com análogos não polares da 8-oxoG. Em seus estudos ficou evidenciado a capacidade da hOGG1 reconhecer três dos quatro análogos testados, já a Fpg reconheceu apenas dois análogos. Segundo o autor, mesmo a hOGG1 reconhecendo mais análogos a mesma possui menor taxa de capacidade de reconhecimento, sugerindo que a Fpg não necessita da ativação do grupo clivado via pontes de hidrogênio ou protonação de base no mecanismo de catálise da excisão de base (MCKIBBIN *et al.*, 2012).

Diante disso, acredita-se que a presença do reconhecimento normal das lesões pela enzima hOGG1 mostrado neste trabalho em comparação ao de Pellosi (2013) (com a enzima Fpg) provavelmente refere-se aos mecanismos diferenciados pelos quais as enzimas de reparo reconhecem suas lesões, onde a hOGG1 alcança perfeitamente os sítios lesionados mesmo na presença do precursor e até mesmo em possíveis casos de intercalação com o DNA.

## 6 CONCLUSÕES

Sobre o papel do DHICA na capacidade de danificar o DNA de células, conclui-se que:

- O composto DHICA na concentração 150  $\mu\text{M}$  não interfere na viabilidade celular após o dano provocado por  $^1\text{O}_2$ .
- O tratamento RBAC-PDT induz um nível de dano oxidativo maior em células da linhagem Melan-A comparado a linhagem B16-F10.
- O DHICA não interfere na capacidade de reparo da lesão 8-oxodGuo em células B16-F10 e Melan-A.
- Não há diferenças na taxa de reparo de 8-oxodGuo em células das linhagens B16-F10 e Melan-A
- O DHICA não interfere no reconhecimento de lesões pela enzima de reparo hOGG1 sobre DNA plasmidial pUC18 oxidado por  $^1\text{O}_2$ .

## REFERÊNCIAS

AGNEZ-LIMA, L. F.; NAPOLITANO, R.; FUCHS, R.; DI MASCIO, P.; MUOTRI, A.; MENCK, C. DNA repair and sequence context affect 1O<sub>2</sub>-induced mutagenesis in bacteria. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 13, p. 2899-903, 2001.

ARGENZIANO, G.; CERRONI, L.; ZALAUDEK, I.; STAIBANO, S.; HOFMANN-WELLENHOF, R.; ARPAIA, N.; BAKOS, R. M.; BALME, B.; BANDIC, J.; BANDELLONI, R. Accuracy in melanoma detection: a 10-year multicenter survey. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 67, n. 1, p. 54-9. e1, 2012.

BACCARELLI, A.; CALISTA, D.; MINGHETTI, P.; MARINELLI, B.; ALBETTI, B.; TSENG, T.; LANDI, M. T. XPD gene polymorphism and host characteristics in the association with cutaneous malignant melanoma risk. **British journal of cancer**, v. 90, n. 2, p. 497-502, 2004.

BAUTE, J.; DEPICKER, A. Base excision repair and its role in maintaining genome stability. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, n. 4, p. 239-76, 2008.

BERANEK, D. T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 231, n. 1, p. 11-30, 1990.

BERWICK, M.; HALPERN, A. Melanoma epidemiology. **Current opinion in oncology**, v. 9, n. 2, p. 178-82, 1997.

BERWICK, M.; VINEIS, P. Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 11, p. 874-897, 2000.

Biologia Net. Melanina. Disponível em <<http://biologianet.uol.com.br/histologia-animal/melanina.htm>> Acesso em 29 de março de 2016.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESSEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5(1), n.1, 2012

BLANKENBURG, S.; KÖNIG, I. R.; MOESSNER, R.; LASPE, P.; THOMS, K. M.; KRUEGER, U.; ZIEGLER, A. No association between three xeroderma

pigmentosum group C and one group G gene polymorphisms and risk of cutaneous melanoma. **European Journal of Human Genetics**, v. 13, n.2, p. 253-55, 2005.

BOTTIROLI, G.; CROCE, A.; BALZARINI, P.; LOCATELLI, D.; BAGLIONI, P.; NOSTRO, P. L.; MONICI, M.; PRATESI, R. Enzyme-assisted Cell Photosensitization: A Proposal for an Efficient Approach to Tumor Therapy and Diagnosis. The Rose Bengal Fluorogenic Substrate. **Photochemistry and photobiology**, v. 66, n. 3, p. 374-83, 1997.

BOYLE, G. M. Therapy for metastatic melanoma: an overview and update. **Expert review of anticancer therapy**, v. 11, n. 5, p. 725-37, 2011.

BRADY, M. S.; OLIVERIA, S. A.; CHRISTOS, P. J.; BERWICK, M.; COIT, D. G.; KATZ, J.; HALPERN, A. C. Patterns of detection in patients with cutaneous melanoma. **Cancer**, v. 89, n. 2, p. 342-7, 2000.

BRESSAC-DE-PAILLERETS, B.; AVRIL, M.-F.; CHOMPRET, A.; DEMENAI, F. Genetic and environmental factors in cutaneous malignant melanoma. **Biochimie**, v. 84, n. 1, p. 67-74, 2002.

BRETZ, F.; HOTHORN, T.; WESTFALL, P. Multiple comparisons using R. **CRC Press**, 2010.

BRIVIBA, K.; SAHA-MÖLLER, C. R.; ADAM, W.; SIES, H. Formation of singlet oxygen in the thermal decomposition of 3-hydroxymethyl-3, 4, 4-trimethyl-1, 2-dioxetane, a chemical source of triplet-excited ketones. **Biochemistry and molecular biology international**, v. 38, n. 4, p.647-651, 1996.

BRUNER, S. D.; NORMAN, D. P.; VERDINE, G. L. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 859-66, 2000.

BURROWS, C. J.; MULLER, J. G. Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission. **Chemical reviews**, v. 98, n. 3, p. 1109-52, 1998.

BYROM, L.; OLSEN, C.; KNIGHT, L.; KHOSROTEHRANI, K.;GREEN, A. C. Increased mortality for pregnancy-associated melanoma: systematic review and meta-analysis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v.29(8), p. 1457-66, 2015



CADET, J.; DOUKI, T.; GASPARUTTO, D.; RAVANAT, J.-L. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 531, n. 1, p. 5-23, 2003.

CADET, J.; TEOULE, R. Comparative study of oxidation of nucleic acid components by hydroxyl radicals, singlet oxygen and superoxide anion radicals. **Photochemistry and photobiology**, v. 28, n. 4-5, p. 661-5, 1978.

CARRERAS, M.C.; PARGAMENT, G.A.; CATZ, S.D.; PODROSSO, J.J.; BOVERIS, A. Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during respiratory burst of human neutrophils. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.341, n. 1, p. 65, 1994.

CHAMBERS, J.M.; FREENY, A.E.; HEIBERGER, R.M. Analysis of Variance; Designed Experiments. **Statistical Models in S, J. M. Chambers and T. J. Hastie** (editors), Wadsworth & Brooks/Cole, Pacific Grove, California, 1992.

CHARKOUDIAN, L. K.; FRANZ, K. J. Fe (III)-coordination properties of neuromelanin components: 5, 6-dihydroxyindole and 5, 6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid. **Inorganic chemistry**, v. 45, n. 9, p. 3657-64, 2006.

CHIN, L. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 8, p. 559-70, 2003.

COLLINS, A. R.; DUSINSKÁ, M.; GEDIK, C. M.; ŠTĚTINA, R. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? **Environmental Health Perspectives**, v. 104, n. Suppl 3, p. 465, 1996.

COLLINS, A. R.; DUŠINSKÁ, M.; HORVÁTHOVÁ, E.; MUNRO, E.; SAVIO, M.; ŠTĚTINA, R. Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measured in vitro with the comet assay. **Mutagenesis**, v. 16, n. 4, p. 297-301, 2001.

CRIADO, P. R.; MELO, J. N.; OLIVEIRA, Z. N. P. Topical photoprotection in childhood and adolescence. **Journal of Pediatrics**, v. 88, n. 3, p. 203-210, 2012.

DAVID, S. S.; O'SHEA, V. L.; KUNDU, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. **Nature**, v. 447, n. 7147, p. 941-50, 2007.

DAVIDS, L.; KLEEMANN, B. Combating melanoma: the use of photodynamic therapy as a novel, adjuvant therapeutic tool. **Cancer treatment reviews**, v. 37, n. 6, p. 465-75, 2011.

DEBNIAK, T.; SCOTT, R.; MASOJC, B.; SERRANO-FERNÁNDEZ, P.; HUZARSKI, T.; BYRSKI, T.; KURZAWSKI, G. MC1R common variants, CDKN2A and their association with melanoma and breast cancer risk. **International journal of cancer**, v. 119, n.11, p. 2597-602, 2006.

DEMENAIS, F.; CHOMPRET, A.; GUILLOUD-BATAILLE, M.; FEINGOLD, N.; GRANGE, F.; AVRIL, M. Interactions between genetic and epidemiological risk factors in cutaneous malignant melanoma in France. **American Journal of Humam Genetics**, v. 59, p. A28, 1996.

DI MASCIO, P.; BECHARA, E. J.; MEDEIROS, M. H.; BRIVIBA, K.; SIES, H. Singlet molecular oxygen production in the reaction of peroxynitrite with hydrogen peroxide. **FEBS letters**, v 355, n. 3, p. 287-89, 1994.

DI PAOLO, C. Aplicação do ensaio cometa a estudo de danos ao DNA de robalos, *Centropomus parallelus* (Poey, 1860), expostos à  $\beta$ -naftoflavona. 2006. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Oceanografia Biológica) – Instituto Ociográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

DUNKERN, T. R.; FRITZ, G.; KAINA, B. Ultraviolet light-induced DNA damage triggers apoptosis in nucleotide excision repair-deficient cells via Bcl-2 decline and caspase-3/-8 activation. **Oncogene**, v. 20, n. 42, p. 6026-38, 2001.

ELWOOD, J.; GALLAGHER, R.; DAVISON, J.; HILL, G. Sunburn, suntan and the risk of cutaneous malignant melanoma--The Western Canada Melanoma Study. **British journal of cancer**, v. 51, n. 4, p. 543, 1985.

FANG, J.; SEKI, T.; MAEDA, H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 4, p. 290–302, 2009.

FERNANDES, N. C.; CALMON, R.; MACEIRA, J. P.; CUZZI, T.; DA SILVA, C. S. C. Melanoma cutâneo: estudo prospectivo de 65 casos Cutaneous melanoma: prospective study of 65 cases. **Anais brasileiro de Dermatologia**, v. 80, n. 1, p. 25-34, 2005.

FOOTE, C. S.; PETERS, J. W. Chemistry of singlet oxygen. XIV. Reactive intermediate in sulfide photooxidation. **Journal of the American Chemical Society**, v.93, n.15, p. 3795-96, 1971.

FRIEDBERG, E. C.; WALKER, G. C.; SIEDE, W.; WOOD, R. D. **DNA repair and mutagenesis**. American Society for Microbiology Press, 2005.

GALLAGHER, R. P.; ELWOOD, J. M.; YANG, C. P. Is chronic sunlight exposure important in accounting for increases in melanoma incidence? **International journal of cancer**, v. 44, n. 5, p. 813-5, 1989.

GALLAGHER, R. P.; LEE, T. K. Adverse effects of ultraviolet radiation: a brief review. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 92, n. 1, p. 119-31, 2006.

GANDINI, S.; MONTELLA, M.; AYALA, F.; BENEDETTO, L.; ROSSI, C. R.; VECCHIATO, A.; CORRADIN, M. T.; DE GIORGI, V.; QUEIROLO, P.; ZANNETTI, G. Sun exposure and melanoma prognostic factors. **Oncology Letters**, v. 11, n. 4, p. 2706-14, 2016.

GARBE, C.; BAUER, J. Melanoma. **Dermatology**, 3rd ed., Elsevier, New York City, 2012.

GENEZ, L. A. L. Relação da vimentina e autofagia com a morte de células Melan-A e B16-F10 tratadas com RBAC-PDT. 2015. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2015

GILLIES, R.; DIDIER, N.; DENTON, M. Determination of cell number in monolayer cultures. **Analytical biochemistry**, v. 159, n. 1, p. 109-13, 1986.

GONZÁLEZ, S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, M.; GILABERTE-CALZADA, Y. The latest on skin photoprotection. **Clinics in dermatology**, v. 26, n. 6, p. 614-26, 2008.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H.; COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 206, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemical journal**, v. 219, n. 1, p. 1, 1984.

HAN, J.; COLDITZ, G. A.; LIU, J. S.; HUNTER, D. J. Genetic variation in XPD, sun exposure, and risk of skin cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 14, n. 6, p. 1539-44, 2005.

HAUSER, J. E.; KADEKARO, A. L.; KAVANAGH, R. J.; WAKAMATSU, K.; TERZIEVA, S.; SCHWEMBERGER, S.; ABDEL-MALEK, Z. A. Melanin content and MC1R function independently affect UVR-induced DNA damage in cultured human melanocytes. **Pigment cell research**, v. 19, n. 4, p. 303-14, 2006

HEARING, V. J.; JIMÉNEZ, M. Mammalian tyrosinase—the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. **International Journal of Biochemistry**, v. 19, n. 12, p. 1141-7, 1987.

HELD, A. M.; HALKO, D. J.; HURST, J. K. Mechanisms of chlorine oxidation of hydrogen peroxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 100 n. 18, p. 5732-40, 1978.

HSU, T. C.; FEUN, L.; TRIZNA, Z.; SAVARAJ, N.; SHIRLEY, L. R.; FURLONG, C. L.; KUCUK, O. Differential sensitivity among three human subpopulations in response to 4-nitroquinoline-1-oxide and to bleomycin. **International journal of oncology**, v. 3, p. 827, 1993.

Instituto Nanocell. Risco de melanoma, câncer da pele, é aumentado em 80% em adolescentes. Disponível em < <http://www.institutonanocell.org.br/risco-de-melanoma-cancer-da-pele-e-aumentado-em-80-em-adolescentes/>>. Acesso em 7 de março de 2016.

ITO, S., WAKAMATSU, K. Chemistry of mixed melanogenesis - pivotal roles of dopaquinone. **Photochemistry and photobiology**, v. 84, n. 3, p. 582-92, 2008.

IVES, N. J.; STOWE, R. L.; LORIGAN, P.; WHEATLEY, K. Chemotherapy compared with biochemotherapy for the treatment of metastatic melanoma: a meta-analysis of 18 trials involving 2,621 patients. **Journal of clinical oncology**, v. 25, n. 34, p. 5426-34, 2007.

IZUMI, T.; BROWN, D. B.; NAIDU, C.; BHAKAT, K. K.; MACINNES, M. A.; SAITO, H.; CHEN, D. J.; MITRA, S. Two essential but distinct functions of the mammalian abasic endonuclease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 16, p. 5739-43, 2005.

JIANG, S.; LIU, X.-M.; DAI, X.; ZHOU, Q.; LEI, T.-C.; BEERMANN, F.; WAKAMATSU, K.; XU, S.-Z. Regulation of DHICA-mediated antioxidation by dopachrome tautomerase: implication for skin photoprotection against UVA radiation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 9, p. 1144-51, 2010.

KANOFISKY, J. R. Singlet oxygen production by lactoperoxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v.258 n.10, p. 5991-93, 1983.

KIPP, C.; YOUNG, A. R. The Soluble Eumelanin Precursor 5, 6-Dihydroxyindole-2-carboxylic Acid Enhances Oxidative Damage in Human Keratinocyte DNA after UVA Irradiation. **Photochemistry and photobiology**, v. 70, n. 2, p. 191-8, 1999.

KOBAYASHI, T.; URABE, K.; WINDER, A.; JIMENEZ-CERVANTES, C.; IMOKAWA, G.; BREWINGTON, T.; SOLANO, F.; GARCIA-BORRON, J.; HEARING, V. Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. **The EMBO journal**, v. 13, n. 24, p. 5818, 1994.

KÖRNER, A. M.; PAWELEK, J. Dopachrome conversion: a possible control point in melanin biosynthesis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 75, n. 2, p. 192-5, 1980.

KORNER, A.; PAWELEK, J. Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. **Science**, v. 217, n. 4565, p. 1163-5, 1982.

KOVACS, D.; FLORI, E.; MARESCA, V.; OTTAVIANI, M.; ASPITE, N.; DELL'ANNA, M. L.; PANZELLA, L.; NAPOLITANO, A.; PICARDO, M.; D'ISCHIA, M. The eumelanin intermediate 5, 6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid is a messenger in the cross-talk among epidermal cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 4, p. 1196-205, 2012.

KÜLTZ, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. **Annual Review Physiology**, v. 67, p. 225-57, 2005.

KUMARAVEL, T.; VILHAR, B.; FAUX, S. P.; JHA, A. N. Comet assay measurements: a perspective. **Cell biology and toxicology**, v. 25, n. 1, p. 53-64, 2009.

LAKHANI, A.; OLEARNIK, H.; EAYRES, D. Compendium of clinical and health indicators. **London: The Information Centre for Health and Social Care/National Centre for Health Outcomes Development**, 2008.

LANDI, M. T.; BACCARELLI, A.; TARONE, R. E.; PESATORI, A.; TUCKER, M. A.; HEDAYATI, M.; GROSSMAN, L. DNA repair, dysplastic nevi, and sunlight sensitivity in the development of cutaneous malignant melanoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94 n. 2, p.94-101, 2002.

LANE, A. M.; KIM, I. K.; GRAGOUDAS, E. S. Long-term risk of melanoma-related mortality for patients with uveal melanoma treated with proton beam therapy. **JAMA ophthalmology**, v. 133, n.7, p.792-96, 2015.

LEME, D. M.; DE OLIVEIRA, G. A. R.; MEIRELES, G.; DOS SANTOS, T. C.; ZANONI, M. V. B.; DE OLIVEIRA, D. P. Genotoxicological assessment of two reactive dyes extracted from cotton fibres using artificial sweat. **Toxicology in Vitro**, v. 28, n. 1, p. 31-8, 2014.

LUTTRULL, D. K.; VALDES-AGUILERA, O.; LINDEN, S. M.; PACZKOWSKI, J.; NECKERS, D. C. Rose Bengal aggregation in rationally synthesized dimeric systems. **Photochemistry and Photobiology**, v. 47, n. 4, p. 551–557, 1988.

MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. Utilização de endoperóxidos de derivados de naftaleno como fontes químicas de oxigênio singlete em sistemas biológicos. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 686-89, 1999.

MCKIBBIN, P. L.; KOBORI, A.; TANIGUCHI, Y.; KOOL, E. T.; DAVID, S. S. Surprising repair activities of nonpolar analogs of 8-oxoG expose features of recognition and catalysis by base excision repair glycosylases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 3, p. 1653-61, 2012.

MCKINNON, P. J. DNA repair deficiency and neurological disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 2, p. 100-12, 2009.

MCPHERSON, M.; ELWOOD, M.; ENGLISH, D. R.; BAADE, P. D.; YOUL, P. H.; AITKEN, J. F. Presentation and detection of invasive melanoma in a high-risk population. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, n. 5, p. 783-92, 2006.

MELLON, I.; CHAMPE, G. N. Products of DNA mismatch repair genes mutS and mutL are required for transcription-coupled nucleotide-excision repair of the lactose operon in Escherichia coli. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.93, n. 3, p.1292-97, 1996.

MELLON, I.; RAJPAL, D. K.; KOI, M.; BOLAND, C. R.; CHAMPE, G. N. Transcription-coupled repair deficiency and mutations in human mismatch repair genes. **Science**, v. 272, n. 5261, p. 557, 1996.

MEMOLI, S.; NAPOLITANO, A.; D'ISCHIA, M.; MISURACA, G.; PALUMBO, A.; PROTA, G. Diffusible melanin-related metabolites are potent inhibitors of lipid

peroxidation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1346, n. 1, p. 61-8, 1997.

MENDES, G. L. Q. Melanoma no Brasil: tendência temporal de mortalidade com modelagem idade-período-coorte, e análise de sobrevida em coorte hospitalar. 2014. 134f. Tese (Doutorado em Saúde Pública). Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca. Rio de Janeiro. 2014.

MINOWA, O.; ARAI, T.; HIRANO, M.; MONDEN, Y.; NAKAI, S.; FUKUDA, M.; ITOH, M.; TAKANO, H.; HIPPOU, Y.; ABURATANI, H. Mmh/Ogg1 gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 8, p. 4156-61, 2000.

MOLLOY, M. J.; HALL, V. S.; BAILEY, S. I.; GRIFFIN, K. J.; FAULKNER, J.; UDEN, M. Effective and robust plasmid topology analysis and the subsequent characterization of the plasmid isoforms thereby observed. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 16, p. e129-e, 2004.

MONTAUDIÉ, H.; BERTOLOTTO, C.; BALLOTTI, R.; PASSERON, T. Fisiología del sistema pigmentario. Melanogénesis. **EMC-Dermatología**, v. 48, n. 1, p. 1-11, 2014.

NEUMANN, A. S.; STURGIS, E. M.; WEI, Q. Nucleotide excision repair as a marker for susceptibility to tobacco-related cancers: A review of molecular epidemiological studies. **Molecular carcinogenesis**, v. 42 n. 2, p. 65-92, 2005.

OLSEN, C. M.; WILSON, L. F.; GREEN, A. C.; BAIN, C. J.; FRITSCHI, L.; NEALE, R. E.; WHITEMAN, D. C. Cancers in Australia attributable to exposure to solar ultraviolet radiation and prevented by regular sunscreen use. **Australian and New Zealand journal of public health**, v. 39, n. 5, p. 471-6, 2015.

PANZELLA, L.; NAPOLITANO, A.; D'ISCHIA, M. Is DHICA the key to dopachrome tautomerase and melanocyte functions? **Pigment cell & melanoma research**, v. 24, n. 1, p. 248-9, 2011.

PAWELEK, J. M.; KÖRNER, A. M. The Biosynthesis of Mammalian Melanin: The regulation of pigment formation, the key to disorders such as albinism and piebaldism, may also offer some clues for the treatment of melanoma. **American scientist**, v. 70, n. 2, p. 136-45, 1982.

PELLOSI, M. C. Ação do precursor da melanina, o ácido 5,6-dihidroxi-indol-2-carboxílico, no dano à 2'-desoxiguanosina e ao DNA plasmidial na presença de



espécies reativas de oxigênio. 2001. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2013.

PELLOSI, M. C.; Suzukawa, A.A.; Scalfio, A.C.; Di Mascio, P.; Pereira C.P.M.; Souza Pinto, N.C.; Martins, D.L., Martinez G.R. Effects of the melanin precursor 5,6-dihidroxy-indole-2-carboxylic acid (DHICA) on DNA damage and repair in the presence of reactive oxygen species. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 557, p.55-64, 2014.

PINTO, A. C. V. D.; CAVALCANTE, M. L. L. L.; DA SILVA, G. V.; DE BRITO, F. F.; OLIVEIRA, A. M. N.; CLETO, N. G. Melanoma maligno: estudo epidemiológico dos casos diagnosticados em unidade de referência em dermatologia em Bauru-SP de 2007 a 2014. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 7, n.2, p. 104-10, 2015.

PROTA, G. LandMarks in Melanin Research. The Pheomelanin Pathway.1<sup>st</sup> ed. London. **Melanin and Melanogenesis**. Academic Press. p.7, 1992.

RAPER, H. The aerobic oxidases. **Physiological Reviews**, v. 8, n. 2, p. 245-82, 1928.

REILLY, T. P.; BELLEVUE, F. H.; WOSTER, P. M.; SVENSSON, C. K. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochemical pharmacology**, v. 55, n. 6, p. 803-10, 1998.

RHODES, A. R.; WEINSTOCK, M. A.; FITZPATRICK, T. B.; MIHM, M. C.; SOBER, A. J. Risk factors for cutaneous melanoma: a practical method of recognizing predisposed individuals. **Jama**, v. 258, n. 21, p. 3146-54, 1987.

RIBEIRO, S. M. R.; DE QUEIROZ, J. H.; PELUZIO, M. D. C. G.; COSTA, N. M. B.; DA MATTA, S. L. P.; DE QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience journal**, v. 21, n. 3, 2006.

RILEY, P. Melanin. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 29, n. 11, p. 1235-9, 1997.

RONSEIN, G. E.; MIYAMOTO, S.; BECHARA, E.; DI MASCIO, P.; MARTINEZ, G. R. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p.563-8, 2006.



ROTH, M.; MÜLLER, H.; BOYLE, J. M. Immunochemical determination of an initial step in thymine dimer excision repair in xeroderma pigmentosum variant fibroblasts and biopsy material from the normal population and patients with basal cell carcinoma and melanoma. **Carcinogenesis**, v. 8(9), p. 1301-07, 1987.

ROUTABOUL, C.; SERPENTINI, C. L.; MSIKA, P.; CESARINI, J. P.; PAILLOUS, N. Photosensitization of supercoiled dna damage by 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid, a precursor of eumelanin. **Photochemistry and photobiology**, v. 62, n. 3, p. 469-75, 1995.

SALVIO, A. G.; MARQUES, M. E. A. Immunohistochemistry for identification of neoplastic cells within brisk infiltrate of thin melanomas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 2, p. 143-8, 2006.

SARTORIUS. Instruções de uso de recipientes de pressão. 5. ed. Goettingen. **Sartorius Stedim Biotech GmbH**, 2015.

SCHADENDORF, D.; FISHER, D. E.; GARBE, C.; GERSHENWALD, J. E.; GROB, J. J.; HALPERN, HERLY, M.; MARCHETTI, M.A.; McARTHUR, G.; RIBAS, A.; ROESCH, A.; HAUSCHILD, A. Melanoma. **Nature Reviews Disease Primers**, 15003, 2015.

SHIBATA, T.; PROTA, G.; MISHIMA, Y. Non-melanosomal regulatory factors in melanogenesis. **Journal of investigative dermatology**, v. 100, n. 3, 1993.

Skin Cancer Foundation. Melanoma Risko Higher for wealthy women. Disponível em: <<http://www.skincancer.org/skin-cancer-information/melanoma/melanoma-causes-and-risk-factors/melanoma-risk-higher-for-the-wealthy>>. Acesso em 16 de março de 2016

SMITH, C. C.; O'DONOVAN, M. R.; MARTIN, E. A. hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. **Mutagenesis**, v. 21, n. 3, p. 185-90, 2006.

SOBOL, R. W.; HORTON, J. K.; KÜHN, R.; GU, H.; SINGHAL, R. K.; PRASAD, R.; RAJEWSKY, K.; WILSON, S. H. Requirement of mammalian DNA polymerase- $\beta$  in base-excision repair. **Nature**, v. 379, n. 6561, p. 183-6, 1996.

SOLHAUG, A.; REFSNES, M.; HOLME, J. A. Role of cell signalling involved in induction of apoptosis by benzo [a] pyrene and cyclopenta [c, d] pyrene in Hepa1c1c7 cells. **Journal of cellular biochemistry**, v. 93, n. 6, p. 1143-54, 2004.

STEINBECK, M. J.; KHAN, A. U.; KARNOVSKY, M.Z.J. Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. **The Journal Of Biological Chemistry**. v. 267, n. 19, p. 13425-33, 1992.

SULAIMON, S. S.; KITCHELL, B. E. The biology of melanocytes. **Veterinary dermatology**, v. 14, n. 2, p. 57-65, 2003.

SUZUKAWA, A. A. Papel da feomelanina na formação de lesões oxidativas pelo oxigênio molecular singlete em DNA e em células de melanoma humano. 2012. 194f. **Tese** (Doutorado em Ciências-Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2012.

SVILAR, D.; GOELLNER, E. M.; ALMEIDA, K. H.; SOBOL, R. W. Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. **Antioxidants & redox signaling**, v. 14, n. 12, p. 2491-507, 2011.

THOMPSON, J. F.; SCOLYER, R. A.; KEFFORD, R. F. Cutaneous melanoma. **The Lancet**, v. 365, n. 9460, p. 687-701, 2005.

TICE, R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.; SASAKI, Y. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-21, 2000.

TOMESCU, D.; KAVANAGH, G.; HA, T., CAMPBELL, H.; MELTON, D. W. Nucleotide excision repair gene XPD polymorphisms and genetic predisposition to melanoma. **Carcinogenesis**, v. 22, n.3, p. 403-08, 2001.

VESTERGAARD, M.; MACASKILL, P.; HOLT, P.; MENZIES, S. Dermoscopy compared with naked eye examination for the diagnosis of primary melanoma: a meta-analysis of studies performed in a clinical setting. **British Journal of Dermatology**, v. 159, n. 3, p. 669-76, 2008.

WATERHOUSE, J. Cancer Incidence in five continents. Lyon, **IARC**, v.5, 1987.

WEI, Q.; LEE, J. E.; GERSHENWALD, J. E.; ROSS, M. I.; MANSFIELD, P. F.; STROM, S. S.; SPITZ, M. R. Repair of UV light-induced DNA damage and risk of cutaneous malignant melanoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 4, p.308-15, 2003.

WILCZEK, A.; MISHIMA, Y. Regulatory factors for polymerization of melanin monomers within coated vesicles and premelanosomes in melanoma cells. **Melanoma research**, v. 3, n. 4, p. 255-62, 1993.

WINSEY, S. L.; HALDAR, N. A.; MARSH, H. P.; BUNCE, M.; MARSHALL, S. E.; HARRIS, A. L.; WELSH, K. I. A variant within the DNA repair gene XRCC3 is associated with the development of melanoma skin cancer. **Cancer Research**, v. 60, n.20, p. 5612-16, 2000.

XAVIER, P. H. P. Estudo detalhado da síntese de melanina em DMSO. 2011. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciencias e Tecnologia de Materiais) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo. 2011.

XIE, Y.; YANG, H.; CUNANAN, C.; OKAMOTO, K.; SHIBATA, D.; PAN, J.; BARNES, D. E.; LINDAHL, T.; MCILHATTON, M.; FISHEL, R. Deficiencies in mouse Myh and Ogg1 result in tumor predisposition and G to T mutations in codon 12 of the K-ras oncogene in lung tumors. **Cancer Research**, v. 64, n. 9, p. 3096-102, 2004.

YANDELL, B. S. Practical data analysis for designed experiments. **CRC Press**, 1997.

ZHANG, X.; ERB, C.; FLAMMER, J.; NAU, W. M. Absolute Rate Constants for the Quenching of Reactive Excited States by Melanin and Related 5, 6-Dihydroxyindole Metabolites: Implications for Their Antioxidant Activity. **Photochemistry and photobiology**, v. 71, n.5, p. 524-533, 2000.

# ANEXO 1 – AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE FIGURA DA REVISTA PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY

28/03/2016

RightsLink Printable License

## JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Mar 28, 2016

This Agreement between Willian Souza ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	3837940401856
License date	Mar 28, 2016
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Photochemistry and Photobiology
Licensed Content Title	Chemistry of Mixed Melanogenesis—Pivotal Roles of Dopaquinone†
Licensed Content Author	Shosuke Ito, Kazumasa Wakamatsu
Licensed Content Date	Nov 16, 2007
Pages	11
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Original Wiley figure/table number(s)	Figure 2
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Languages	English
Title of your thesis / dissertation	AÇÃO DO PRECURSOR DA MELANINA, O ÁCIDO 5,6-DI-HIDROXI-INDOL-2-CARBOXÍLICO (DHICA) NO REPARO DE DNA NAS CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16-F10 E MELANÓCITOS MELAN-A
Expected completion date	Apr 2016
Expected size (number of pages)	80
Requestor Location	Willian Souza pitangua, 23  Curitiba, Brazil 82015480 Attn: Willian Souza
Billing Type	Invoice
Billing Address	Willian Souza pitangua, 23  Curitiba, Brazil 82015480 Attn: Willian Souza
Total	0.00 USD

## ANEXO 2 – AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE FIGURA DA REVISTA NUCLEIC ACIDS RESEARCH

28/03/2016

RightsLink Printable License

### OXFORD UNIVERSITY PRESS ORDER DETAILS

Mar 28, 2016

Order Number	501124892
Order date	Mar 28, 2016
Licensed content publisher	Oxford University Press
Licensed content publication	Nucleic Acids Research
Licensed content title	Effective and robust plasmid topology analysis and the subsequent characterization of the plasmid isoforms thereby observed:
Licensed content author	Michael J. Molloy, Valerie S. Hall, Susannah I. Bailey, Katharine J. Griffin, Jim Faulkner, Mark Uden
Licensed content date	Jan 1, 2004
Type of Use	Thesis/Dissertation
Institution name	None
Title of your work	AÇÃO DO PRECURSOR DA MELANINA, O ÁCIDO 5,6-DIHIDROXI-INDOL-2-CARBOXÍLICO (DHICA) NO REPARO DE DNA NAS CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16-F10 E MELANÓCITOS MELAN-A
Publisher of your work	n/a
Expected publication date	Apr 2016
Permissions cost	Not Available
Value added tax	0,00 USD
Total	Not Available
Total	Not Available

## ANEXO 3 – AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE FIGURA DO SITE DO INSTITUTO NANOCELL

29/03/2016

Gmail - Permissão



Willian Felipe <willianhadiak@gmail.com>

---

### Permissão

**Rodrigo Ribeiro Resende** <rresende@hotmail.com>

29 de março de 2016 08:07

Para: Willian Felipe <willianhadiak@gmail.com>, sbsc@sbsc.org.br, contato@institutonanocecell.org.br

Caro William,

Não é preciso pedir a permissão. O próprio site o permite, apenas citando a fonte.

Att

Rodrigo

Enviado pelo meu Windows Phone

---

**From:** Willian Felipe

**Sent:** 3/28/2016 9:58 PM

**To:** sbsc@sbsc.org.br; contato@institutonanocecell.org.br; rresende@hotmail.com

**Subject:** Permissão

[Texto das mensagens anteriores oculto]